

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Demostrar por PCR convencional la presencia de genes involucrados en la osmorregulación de *Anadara tuberculosa* “concha negra”.**

**Presentada por:**

**Br. KARINA YESENIA ZAPATA VIDAURRE.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE**  
**BIÓLOGA**

**Piura – Perú**

**2018**



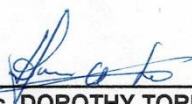
**Br. KARINA YESENIA ZAPATA VIDAURRE**  
**EJECUTOR DE TESIS**



**McBigo. JAIME NAPOLEÓN FERNÁNDEZ PONCE**  
**ASESOR DE TESIS**



**Ph. D. (c) BENOIT DIRINGER**  
**COASESOR DE TESIS**



**M. Sc. DOROTHY TORRES DE LEON**  
**PRESIDENTE DEL JURADO**



**M. Sc. RONALD WILMER**  
**MARCIAL RAMOS**  
**SECRETARIO DEL JURADO**



**Ing. JUAN MANUEL TUME**  
**RUIZ**  
**VOCAL DEL JURADO**



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

## FACULTAD DE CIENCIAS



"AÑO DEL DIALOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL"

### ACTA DE SUSTENTACIÓN 060-2018-D-FC-UNP

#### FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada "DEMOSTRAR POR PCR CONVENCIONAL LA PRESENCIA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA OSMORREGULACIÓN DE *Anadara tuberculosa* "concha negra", presentada por la señorita Bachiller **KARINA YESENIA ZAPATA VIDAURRE**, con el asesoramiento del **MSc. Jaime Napoleón Fernández Ponce** y Co-asesor **Blgo. Benoit Diringer, M.Sc.**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, lo declaran:

APROBADA (x)

DESAPROBADA ( )

Con la mención de:

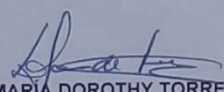
Muy Buena


(x) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.


(x) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 10 octubre del 2018.

UNP

  
McBlgo. **MARIA DOROTHY TORRES DE LEÓN, M.Sc.**  
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

  
Blgo. **RONALD WILMER MARCIAL RAMOS, MSc.**  
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

  
Ing. **JUAN MANUEL TUME RUIZ, M.Sc.**  
VOCAL DE JURADO DE TESIS



## **DEDICATORIA**

A Dios por su amor infinito e influencia en mi vida y en cada meta que emprendo.

A mi familia, de forma especial a mis padres Ediberto Zapata y Tomasa Vidaurre porque con su amor ayudaron a forjar la persona que soy ahora. A mi querida hermana Marissela y a mis lindas sobrinas Valeria y Camila.

A Jimmy López por su cariño y apoyo que significa para mí.

A mis amigos y compañeros de trabajo, que me han permitido crecer de manera personal y acompañarme en el desarrollo de mi vida científica.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me es grato a través de esta investigación mostrar mi sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Piura en la Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y en ella a todos los distinguidos docentes; de forma especial menciono a Cesar Torres, Humberto Rivera y mi asesor Jaime Fernández, quienes con su profesionalismo y ética, puestas de manifiesto en las aulas nos enrumban a ser profesionales con carácter humanístico listos a ser útiles a la sociedad.

Al centro de Investigación INCABIOTEC. SAC y todo su personal, por la confianza depositada en mí, la oportunidad de desarrollo profesional, el financiamiento de esta investigación y orientación continúa hasta su culminación.

A Benoit Diringer y Krizia Pretell por su ejemplo, amistad, exigencia y confianza durante el tiempo que estuvieron vinculados directamente con el desarrollo de la presente investigación.

A todos aquellos que de alguna u otra manera me brindaron su apoyo y ayuda para la culminación de mi tesis.

De todo corazón, ¡muchas gracias!

# ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL	5
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS	9
INDICE DE ANEXOS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	13
II. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1 PUNTO DE EXTRACCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	18
2.1.1. Punto de extracción del material biológico	
2.1.2. Área de ejecución del estudio.	18
2.1.3. Preparación de la muestra.	18
2.2. ANÁLISIS MOLECULARES	
2.2.1. Diseño de primers para genes de referencia COI y Actina.	20
2.2.2. Diseño y evaluación <i>in Silico</i> de sondas moleculares	21

2.2.3. Extracción de ADN	23
2.2.4. Amplificación por PCR	24
2.2.5. Evaluación de genes de osmorregulación	24
2.2.6. Electroforesis	25
III. RESULTADOS	
3.1. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE INICIADORES PARA GENES DE REFERENCIA COI Y $\beta$ -ACTINA	26
3.2. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE INICIADORES DE GENES DE INTERÉS	28
IV. DISCUSIÓN	34
V. CONCLUSIONES	39
VI. RECOMENDACIONES	40
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
VIII. ANEXOS	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 01    Ubicación de la zona de Muestreo en los Manglares de puerto Pizarro Tumbes (Fuente: Elaboración propia)	19
Figura 02    A) Vista panorámica    de los manglares de Puerto Pizarro, B) Recolección de muestras de <i>A. tuberculosa</i> y C) Caracterización morfológica de los diferentes individuos.	19
Figura 03    Búsqueda de secuencias de interés en moluscos bivalvos en la base de datos <i>on line</i> Pubmed del NCBI.	20
Figura 04    Alineamiento de secuencias de interés del género <i>Anadara</i> mediante el programa MEGA 6 con el software Muscle.	21
Figura 05    A) Procesamiento de muestras y B) extracción de ADN.	23
Figura 06    Amplificación por PCR del gen de referencia COI de 02 muestras de ADN extraído de branquias de <i>A. tuberculosa</i> , visualizado en gel de agarosa al 1,5 % C+ (control positivo <i>C. gigas</i> ) Ce (Control negativo de extracción de ADN) y CPCR (control negativo de PCR), M1, M2 y M3 (muestras) MP (marcador de peso molecular).	27
Figura 07    Amplificación por PCR del gen de referencia $\beta$ -Actina de 03 muestras de ADN extraído de branquias de <i>A. tuberculosa</i> , visualizado en gel de agarosa al 1,5 %. C+ (control positivo <i>C. gigas</i> ) Ce (Control negativo de extracción de ADN) y C- (control negativo de PCR), M1, M2 y M3 (muestras) MP (marcador de peso molecular).	27
Figura 08    Visualización en gel de agarosa al 1,5% de ampliaciones obtenidos por PCR simple de genes de interés que intervienen	29



en el sistema de osmorregulación de bivalvos. Utilizando como controles positivos ADN de *C. gigas* (C y D) y muestras (A y B). (1) Glycine dehidrogenase (2) Spermidine sintasa (3) Aldehyde deshidrogenase (4) ATP grasp (5) Cysteina sulfinica (6) Bomba de Na<sup>+</sup> y Cl. y MP: marcador de peso molecular.

Figura 09	Material empleado para la extracción de ADN de branquias de <i>Anadara tuberculosa</i> .	49
Figura 10	Extracción de ADN de branquias de <i>Anadara tuberculosa</i> .	49
Figura 11	Material empleado para la extracción de proteínas de branquias de <i>Anadara tuberculosa</i> .	50
Figura 12	Electroforesis de las proteínas recuperadas.	50
Figura 13	Espectrómetro de masas 4800 MALDI TOF-MS empleado para el análisis de proteínas.	51

## INDICE DE TABLAS

Tabla 01	Evaluación de los iniciadores diseñados dirigidos a genes involucrados en la osmorregulación de bivalvos a diferentes temperaturas de hibridación.	17
Tabla 02	Descripción y número de acceso de las secuencias usadas en el diseño de iniciadores.	21
Tabla 03	Secuencias de péptidos de interés obtenido mediante MALDI TOF TOF en muestras a tres salinidades 5, 15 y 25 ppt.	46

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Tabla 4.2. Secuencias de péptidos de interés obtenido mediante MALDI TOF TOF en muestras a tres salinidades 5, 15 y 25 ppt.	46
Anexo 2	Protocolo de extracción de proteínas	47
Anexo 3	Extracción de ADN de branquias de moluscos por método bromuro trimetil amonio de cetilo (CTAB)	48
Anexo 4	Galería de fotos	49

## RESUMEN

El molusco *Anadara tuberculosa* (concha negra) es una especie del ecosistema manglar de Tumbes que se encuentra actualmente en una condición vulnerable. Ante esto se desea desarrollar su cultivo; sin embargo, se conoce poco sobre su regulación al estrés salino haciendo necesario la identificación de biomarcadores moleculares, particularmente los asociados a la osmorregulación. Con este propósito, se recolectaron ejemplares de *A. tuberculosa* en los manglares adyacentes de la bahía de Puerto Pizarro (Tumbes, Perú). La presencia de biomarcadores de estrés de salinidad se evaluó a nivel genético con la detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de 17 genes claves de la osmorregulación en bivalvos. Ninguno de los marcadores genéticos probados pudo ser amplificado por PCR, lo que sugiere que *A. tuberculosa* tiene diferencias genéticas significativas en comparación con otros moluscos. Estos resultados nos sugieren continuar ensayos que permitan identificar los marcadores moleculares específicos a esta especie para desarrollar futuras investigaciones de ecofisiología de este importante recurso pesquero.

Palabras clave: *Molusco, estrés salino, genética, biomarcadores moleculares.*

## ABSTRACT

The mollusk *Anadara tuberculosa* (pustulose ark) is a specie of the mangrove ecosystem of Tumbes that is currently in a vulnerable condition. For this, it is deseared to develop its crop; however, little is known about its regulation of saline stress, making it necessary the identification molecular biomarkers, particularly those related with osmoregulation. With this purpose, specimens of *A. tuberculosa* were collected in the adjacent mangroves of Puerto Pizarro Bay (Tumbes, Peru). The presence of salinity stress biomarkers was evaluated at the genetic level with the detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) of 17 key genes of osmoregulation in bivalves. None of the genetic markers tested heve been amplified by PCR, suggesting that *A. tuberculosa* has significant genetic differences compared to other molluscs. These results suggest us to continue trials that allow the identification of molecular markers specific to this species in order to develop future ecophysiology investigations of this important fishery resource.

Key words: *Mollusk, salt stress, genetics, molecular biomarkers.*

## INTRODUCCIÓN

El molusco *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833), popularmente conocida en Perú como concha negra, es un bivalvo perteneciente a la familia Arcidae, que se distribuye a lo largo de la costa del Océano Pacífico, desde Baja California, México hasta Tumbes, Perú (Espinosa et al., 2010 y Cruz et al., 2012); habita la zona intermareal, asociada a los sustratos fangosos, arcillosos o limo-arcillosos del ecosistema de manglar (Mendoza y Peralta, 2004). Este recurso pesquero se explota artesanalmente por extractores conocidos como “concheros” quienes sustentan parte de su economía con el comercio de este molusco; sin embargo, la mayoría de los bancos naturales de Suramérica se encuentran actualmente sobreexplotados y algunas poblaciones están cercanas al colapso (Lucero, Cantera, y Neira, 2012). En Perú, las poblaciones de *A. tuberculosa* se han reducido en un 73.2 % durante el periodo de 1996 al 2007 (Ordinola et al., 2007).

Actualmente, se están realizando actividades alternativas como la producción de semillas en laboratorio, con experiencias favorables en México, El Salvador, Perú y Ecuador. En Perú, el engorde de semillas producidas en laboratorio y transferidas al manglar ha sido un éxito. Sin embargo, algunas poblaciones presentaron elevadas mortalidades en áreas sometidas al descenso de la salinidad durante los meses de lluvia (Diringer et al., 2012; Pretell, 2015-comunicación personal) evidenciando la sensibilidad de este molusco al estrés de salinidad.

En ensayos posteriores de evaluación de la sensibilidad al estrés de salinidad de semillas de 5 mm, se determinó que las semillas expuestas a salinidades de 25 a 35 partes por mil (ppt) no presentaban mortalidades mientras que los individuos

mantenidos a salinidades de 15 a 0 ppt sufrieron dramáticas mortalidades desde el segundo día de aclimatación (Diringer et al., 2009).

A diferencia de la carente información existente para *A. tuberculosa*, las ostras han sido más extensamente estudiadas en términos de ecofisiología, esto debido a la importancia económica de este grupo para la producción acuícola mundial (FAO, 2012). Actualmente se han desplegado estudios para conocer el genoma completo de la ostra *Crassostrea gigas* mediante secuenciado por técnicas de Next generation sequencing NGS (Zhang et al., 2012). Así también, Lacoste et al., (2001) estudiaron la respuesta al estrés considerando las hormonas implicadas en la modulación de las funciones fisiológicas, tales como la noradrenalina (NA) y la dopamina (DA) cuyas concentraciones en la hemolinfa aumentan en respuesta al estrés relacionado con la variación de la salinidad.

Los efectos combinados de la temperatura y salinidad o de la salinidad y concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> sobre el sistema inmunitario de la ostra *Cassostrea gigas* fueron analizados diferentes equipos (Gagnaire et al., 2006 y Dickinson et al., 2012) y mostraron el efecto directo de estos tipos de estrés sobre dicha función primordial de defensa de los moluscos frente a numerosos agentes patógenos presentes en el medio.

Los principales mecanismos de adaptación a diferentes salinidades de la ostra y del mejillón han sido caracterizados a nivel molecular (Cross et al., 2014; Eierman y Hare, 2014); en particular Meng et al., 2013, resaltaron la primordial importancia de las vías de metabolismo de los amino ácidos libres (Free Amino Acids o FAAs)

para la adaptación eurihalina de la ostra *C. gigas*. A pesar que la mayoría de los trabajos han sido realizados en diferentes especies de bivalvos, es muy probable que los mecanismos de osmorregulación se conserven a nivel interespecífico.

Las FAA son los principales osmolitos de los moluscos marinos, cuyo proceso de osmo-conformista es vital para la adaptación a la salinidad ambiental debido a la falta de homeostasis osmótica. Los resultados de Meng et al. (2013) muestran a Taurina, como el más abundante componente de FAA en las ostras, contribuye predominantemente a la regulación osmótica, aunque Glicina, Alanina y Prolina jugaron roles más importantes en condiciones de estrés por hiperosmolalidad.

La tecnología de PCR desarrollada por Kary Mullis en 1983, se ha utilizado en varios estudios recientes como medios rápidos de amplificación de las regiones de ADN para el propósito específico de detectar la heterogeneidad entre y dentro de las especies (Gürtler y Stanisich, 1996). Los estudios llevados a cabo hasta la fecha que han utilizado Amplificación basada en PCR demuestran la versatilidad de las muestras en que se puede utilizar la técnica y su gran enfoque sensible (Liu et al., 2015).

A más de tres décadas de su aparición, la Reacción en Cadena de la Polimerasa es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Por ello, se ha convertido en el método de elección de muchos investigadores para los estudios genéticos y de biología molecular. La



reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o iniciadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio ( $Mg^{+}$ ), una solución amortiguadora o buffer y  $H_2O$ . (Tamay de Dios et al., 2013).

El proceso que tiene lugar durante la PCR se puede resumir de la siguiente forma: partiendo de un DNA molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde. Los cambios de temperatura constituyen la base para que se completen los pasos necesarios. El proceso se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación (Pérez de Castro, 2010)

Los productos de amplificación son separados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta (Giorgio et al. 2009)

Es sabido que la técnica de PCR está ligada a la extracción de ADN de la muestra en estudio, por lo que la concentración celular constituye uno de los factores críticos en la eficiencia de la amplificación (Naranjo, et al. 2013), las suspensiones celulares, el exceso de ADN, entre otros pueden ejercer un efecto inhibitor sobre la reacción de PCR. Para estabilizar la reacción de PCR se utilizan aditivos como la albumina de suero bovino BSA (Mauk et al., 2016); otra forma de

optimizar la reacción es mediante las distintas concentraciones de los componentes de la PCR.

Como se ha mencionado, existe una carencia en investigaciones de genómica en *A. tuberculosa* que no nos permiten establecer marcadores osmóticos. Una herramienta útil es la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En esta investigación se utilizó por primera vez la técnica PCR para entender los posibles genes que le permiten a *A. tuberculosa* una tolerancia significativa al estrés salino. Al ser un trabajo exploratorio fue necesario primero realizar ensayos *in silico* con programas bioinformáticos que nos ayuden a predecir y evaluar los posibles iniciadores o *primer* que puedan ser usados para el desarrollo de la técnica. Estos iniciadores fueron diseñados principalmente a partir de secuencias de genes de *Crassostrea gigas* que a diferencia de *A. tuberculosa* posee un genoma ya secuenciado. Después de una cuidadosa selección y diseño se obtuvieron los 19 juegos de iniciadores y estos fueron probados en ADN genómico de *A. tuberculosa* y *C. gigas*. El mecanismo genómico de regulación del molusco estuarino *A. tuberculosa* aún nos es desconocido; sin embargo, nuestros resultados marcan la base para continuar realizando ensayos moleculares en esta especie de suma importancia para América y el Perú.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de genes de osmorregulación claves en otros bivalvos en *Anadara tuberculosa* “concha negra” mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) validando la técnica con la amplificación de genes endógenos.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **2.1.1. Punto de extracción del material biológico**

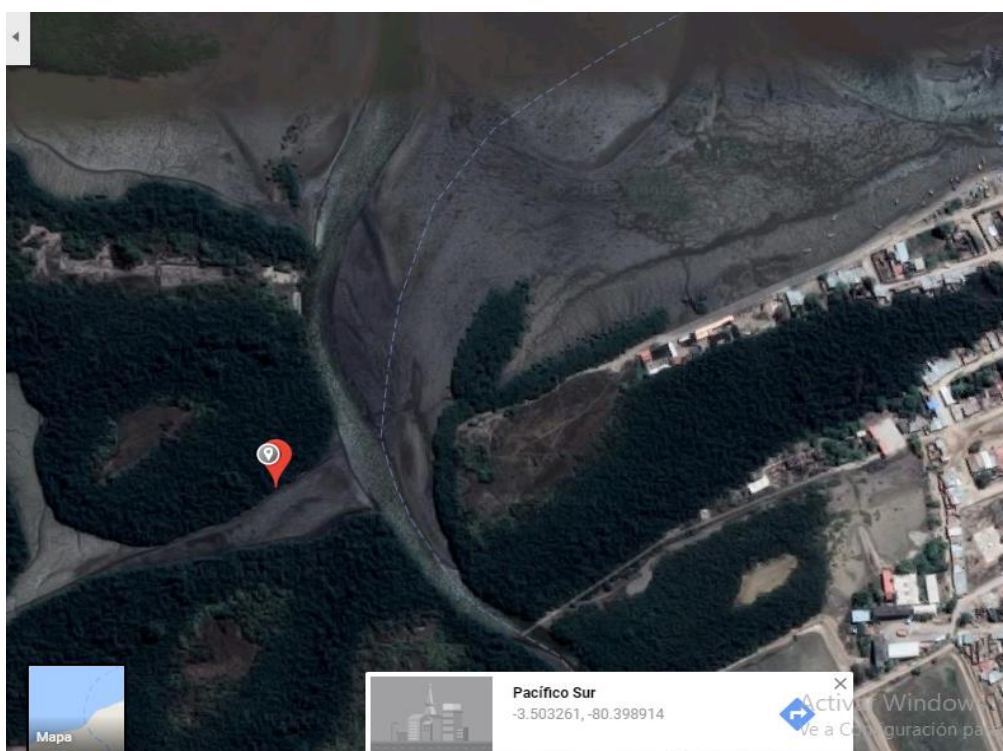
Los individuos fueron extraídos de los bancos naturales de Puerto Pizarro, Tumbes. ubicado en 3° 24´ Latitud Sur (frontera con el Ecuador, Canal Internacional y Punta de Capones) hasta los 3° 55´ Latitud Sur (Playa Hermosa), y desde los 80° 13´08" hasta los 80° 31´03" Longitud Oeste (ONERN-1992). (Fig. 01).

#### **2.1.2. Transporte de la muestra.**

Veinte individuos adultos de *Anadara tuberculosa* "concha negra" con longitud de valva mayor a 4.5 cm se transportaron en un corcho adecuado con gel pack hasta el centro de investigación donde se ejecutó el proyecto.

#### **2.1.3. Área de ejecución del estudio.**

El presente estudio se ejecutó en la empresa INCABIOTEC S.A.C. ubicada en la ciudad de Tumbes, Perú.



**Figura 01.** Ubicación de la zona de Muestreo en los Manglares de puerto Pizarro, Tumbes.  
(Fuente: elaboración propia)



**Figura 02.** **A)** Vista panorámica de los manglares de Puerto Pizarro, **B)** Recolección de muestras de *A. tuberculosa* y **C)** Caracterización morfológica de los diferentes individuos.

## 2.2. ANÁLISIS MOLECULARES

### 2.2.1. Diseño, estandarización y evaluación *in silico* de iniciadores para genes de referencia COI y $\beta$ actina.

El diseño de los iniciadores que permitieron amplificar fragmentos de los genes constitutivos y conservados COI (Citocromo Oxidasa I) y Beta actina ( $\beta$ -actina), escogidos como controles internos, se realizó mediante el alineamiento de secuencias en el programa MEGA 6 (Fig. 04), localizando regiones homologas en diferentes especies de moluscos bivalvos y especialmente en individuos perteneciente al género *Anadara* (Vrijenhoek, 1994).

En base al análisis de las zonas homologas, se seleccionó las regiones candidatas que sirvieron para la elaboración de los iniciadores. Gracias al programa Primer 3, fue posible evaluar las propiedades termodinámicas de dichas regiones, este paso facilitó la optimización de las amplificaciones por PCR.

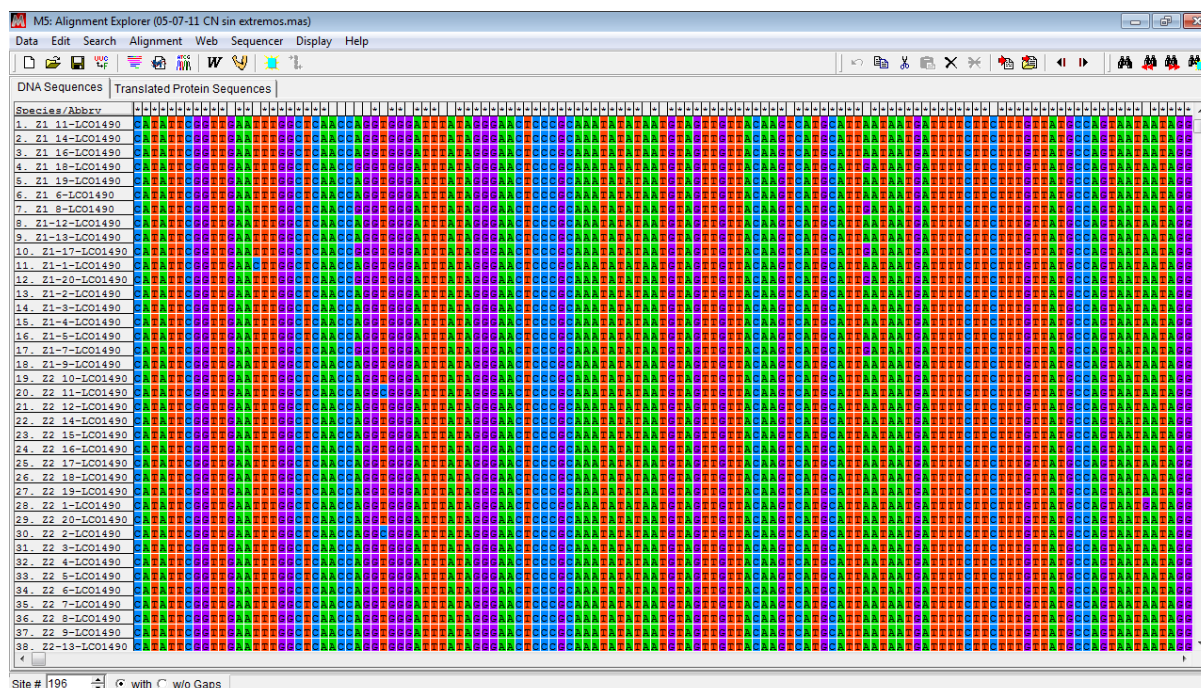
The screenshot shows the NCBI Nucleotide search interface. The search term 'Actin mollusc' is entered in the search bar. The results page displays a list of 396 nucleotide sequences. The first three results are highlighted:

- Crassostrea gigas mRNA for actin related protein 2/3 complex, 21 kDa subunit (arpc3 gene)**  
Accession: AJ563460.1 GI: 40642997  
543 bp linear mRNA  
Links: [Protein](#), [Taxonomy](#), [GenBank](#), [FASTA](#), [Graphics](#)
- Aplysia dactylomela actin mRNA, 3' UTR**  
Accession: HM191489.1 GI: 310686615  
576 bp linear mRNA  
Links: [Taxonomy](#), [GenBank](#), [FASTA](#), [Graphics](#)
- Laccaria bicolor S238N-H82 LACBI scaffold\_13 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence**  
Accession: DS547103.1 GI: 164643371  
1,105,879 bp linear DNA  
Links: [Assembly](#), [BioProject](#), [BioSample](#), [Protein](#), [PubMed](#), [Taxonomy](#), [GenBank](#), [FASTA](#), [Graphics](#)

The right sidebar shows 'Results by taxon' with a list of top organisms including *Vibrio parahaemolyticus*, *gamma proteobacterium symbiont of Ctena orbiculata*, *Vibrio alginolyticus*, *Laccaria bicolor S238N-H82*, and *Enterococcus faecium*. The 'Find related data' section shows a dropdown menu for 'Database' and a 'Find items' button. The 'Search details' section shows the search criteria: 'Actin[All Fields] AND mollusc[All Fields]' and a button to 'Activar Windows'.

11. [Anadara kagoshimensis isolate 01 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds; mitochondrial](#)  
657 bp linear DNA  
Accession: KF417435.1 GI: 533051065  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)
12. [Anadara sp. BOLD:ACA1972 voucher LMBLP10-002 cytochrome oxidase subunit 1 \(COI\) gene, partial cds; mitochondrial](#)  
661 bp linear DNA  
Accession: KF369107.1 GI: 564282499  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
13. [Anadara sp. BOLD:ACA1972 voucher LMBLP10-001 cytochrome oxidase subunit 1 \(COI\) gene, partial cds; mitochondrial](#)  
661 bp linear DNA  
Accession: KF369106.1 GI: 564282498  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
14. [Anadara sativa voucher AS20MT02 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds; mitochondrial](#)  
658 bp linear DNA  
Accession: JF700133.1 GI: 336038659  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
15. [Anadara sativa voucher AS20MT01 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds; mitochondrial](#)  
658 bp linear DNA  
Accession: JF700132.1 GI: 336038657

**Figura 03.** Búsqueda de secuencias de interés en moluscos bivalvos en la base de datos *on line* Pubmed del NCBI.



**Figura 04.** Alineamiento de secuencias de interés del género *Anadara* mediante el programa MEGA 6 con el software Muscle.



### **2.2.2. Diseño, estandarización y evaluación *in Silico* de sondas moleculares asociadas a la osmorregulación.**

Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre estudios genéticos de bivalvos en el caso de iniciadores que reconozcan regiones conservadas, y se tomó en cuenta la información disponible en genbank, durante la etapa de revisión bibliográfica del proyecto. Se utilizó el portal web [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) y se procedió a la selección y análisis de secuencias. Para el diseño de los iniciadores que fueron usados para amplificar fragmentos genéticos relacionados a la osmorregulación. Se seleccionaron algunas secuencias publicadas y fueron analizadas en el programa MEGA4. El programa indicó en gráficos las secuencias “homologas” entre varias especies de moluscos como *Mytillus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* y *Crassostrea gigas*.

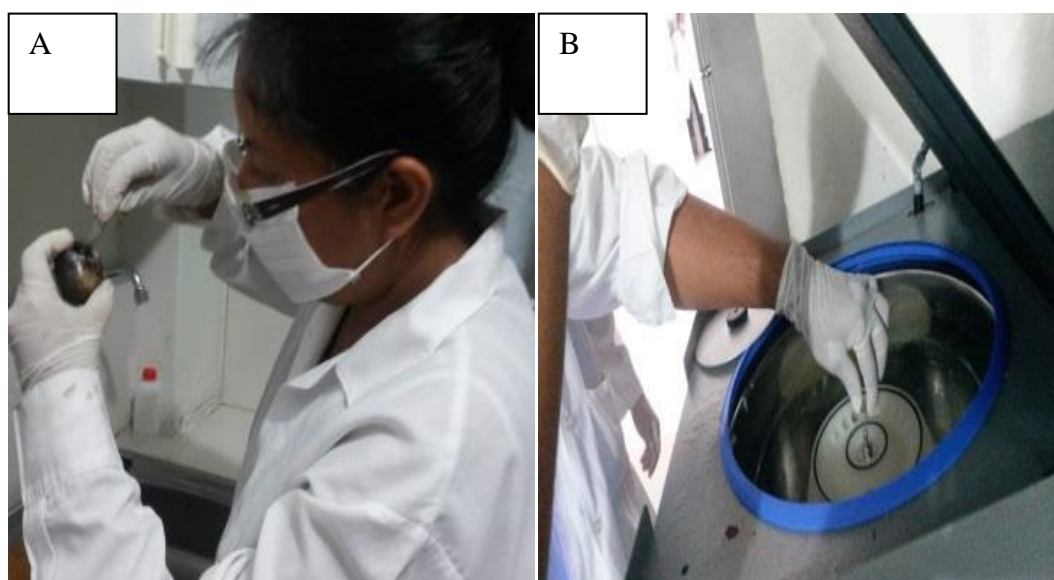
En base a este análisis, se seleccionaron las regiones candidatas para servir como iniciadores. Se evaluaron las propiedades termodinámicas ideales de dichas regiones en el sitio *on line*: OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/oligoanalyzer>) lo que facilitó la subsecuente optimización de las condiciones de la reacción de PCR.

Una vez seleccionados los iniciadores candidatos, se confirmó sus especificidades hacia secuencias de bivalvos mediante un alineamiento en el portal [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com). Se mandó a sintetizar los iniciadores seleccionados en IDT en USA.

### **2.2.3. Extracción de ADN**

Se abrieron los 20 individuos y se formaron dos muestras de 100 mg de tejido branquial macerado (10 individuos para cada muestra). La ruptura celular fue realizada mediante digestión en calor a 55 °C por 2 horas, utilizando la solución de lisis CTAB (Tris HCl 100mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2 %), complementado con proteinasa K (0,2 mmol/mL). La solución fue tratada con RNAasa (0,4 mg/mL) a 65 °C por 10 minutos. El proceso de purificación se realizó con Fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de volumen (25:24:1). Para la sedimentación de ADN se

utilizó etanol frío al 95 % con un lavado posterior en etanol al 75 %. Finalmente, el pellet de ADN que se obtuvo fue resuspendido en 100 microlitros ( $\mu$ l) de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) y conservado a -20 °C. Se trabajó además con un control negativo de extracción el cual recibió el mismo tratamiento pero no contenía muestra.



**Figura 05.** A) Procesamiento de muestras y B) extracción de ADN

#### **2.2.4. Amplificación por PCR de los genes COI y $\beta$ -Actina**

A las muestras de ADN extraído se les realizó una prueba de PCR, dirigida a los genes constitutivos COI y  $\beta$ -Actina y para utilizarlos como control interno evaluando la calidad del ADN y descartando la presencia de inhibidores de la PCR (polisacáridos, exceso de sales, exceso de alcohol). Para esta prueba se colocaron 20 pmol de los iniciadores diseñados. La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 50  $\mu$ l con el kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) conteniendo Buffer de PCR (1X),  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (2.5 mM) y Taq polimerasa (2U), dNTPs (0,2 mM) y complementada con albumina de suero bovino BSA (1 mg/mL), se utilizó un termociclador Techne TC-312 (TECHNE). La programación del termociclador fue de 95 °C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos para la desnaturalización,



50°C por 45 segundos para la hibridación y 72 °C por 45 segundos para la polimerización, un ciclo de 72 °C por 5 minutos de polimerización final y un ciclo final de conservación de 4° C por un tiempo de hasta 24 horas. Una vez culminada la PCR se procedió a guardar los amplicones a -20°C.

#### **2.2.5. Evaluación de genes de osmorregulación**

Las reacciones de PCR para amplificación de genes de interés fueron realizadas de igual manera con el kit de DNA Polymerase (Invitrogen), a partir de muestras que lograron ser amplificadas por PCR por los genes  $\beta$ -Actina y COI utilizados como controles internos. La programación fue de 95 °C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, cada ciclo de 94 °C por 30 segundos para la desnaturalización, la temperatura de hibridación fue de acuerdo al análisis *in silico* que se realizó para cada juego de iniciadores, por un tiempo de 45 segundos y 72°C por 45 segundos para la polimerización y un ciclo final de 72 °C por 5 minutos de polimerización final. Para cada gen evaluado se incluyó un control negativo de PCR, y dos controles positivos (ADN genómico de *C. gigas*).

#### **2.2.6. Electroforesis**

Mediante esta técnica fue posible observar por fluorescencia los resultados de la amplificación de la técnica PCR. Para esto se preparó gel de agarosa al 1.5% de concentración, con un contenido de 0.9 gramos de agarosa y 3 µl de bromuro de etidio para 60 mililitros de gel. Por cada pocillo en el gel se colocó 8 µl de la muestra (amplicones de PCR) y 2 µl de tampón de depósito (azul de bromofenol). Se colocó un pocillo con 6 µl de marcador de peso molecular. Se migraron los amplicones a un voltaje de 70 voltios por 30 minutos. Por último se observaron los resultados en el transiluminador UV y se documentó por fotografía (Figura 06, 07 y 08)

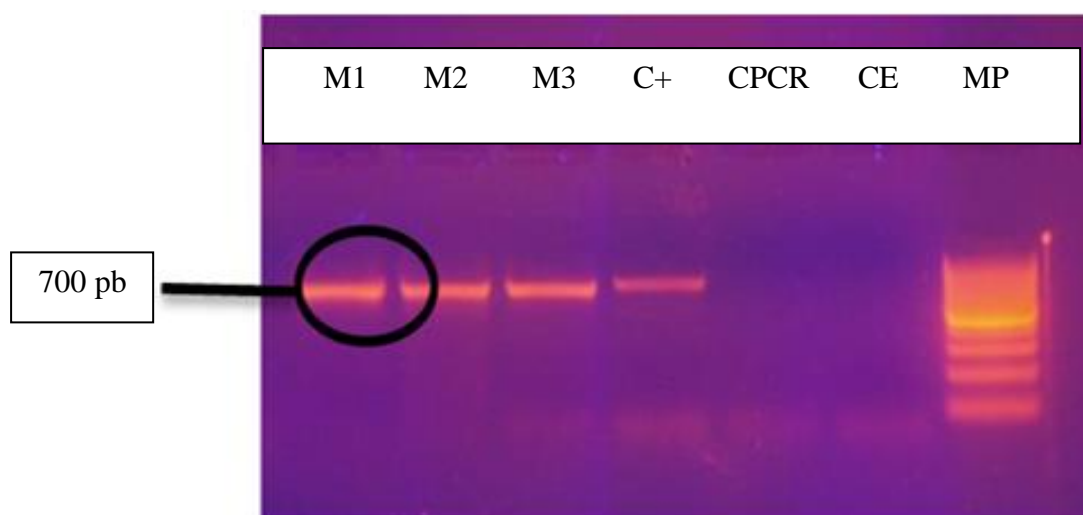
### III. RESULTADOS

#### 3.1. EVALUACIÓN DE LOS INICIADORES DISEÑADOS PARA GENES DE REFERENCIA COI Y B-ACTINA DE *A. tuberculosa*

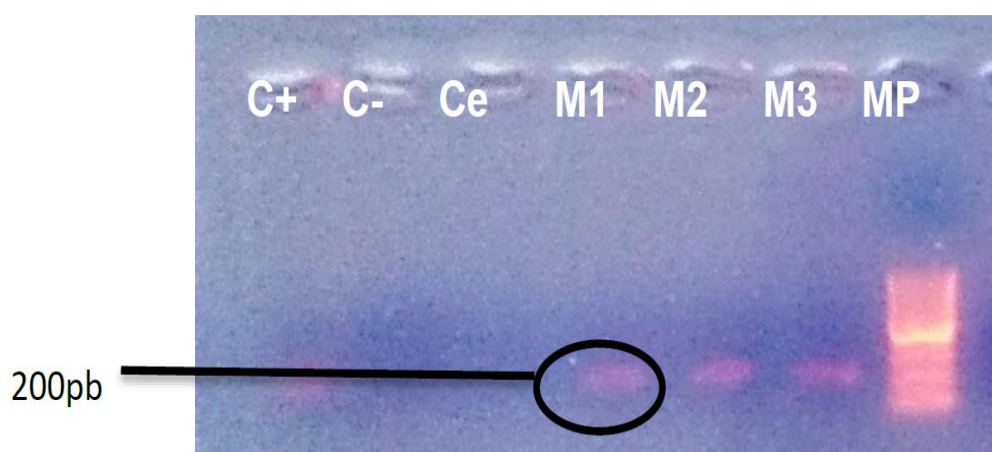
Se logró obtener 2 juegos de iniciadores a través del alineamiento de las secuencias disponibles en Pubmed de los genes COI y  $\beta$ -Actina pertenecientes a la familia Arcidae.

El juego de iniciadores para el gen de  $\beta$ -Actina fue constituido por un iniciador Sentido (forward) Bi-Actin-Fw (5'-TTCTTGGGAATGGAATCTGC-3') y un Iniciador anti sentido (reverse) Bi-Actin-Rev2 (5'-CCTCTCTGGTGGAGCAATGAT-3'). La temperatura de hibridación (Melting) calculada y utilizada fue de 50°C. El juego de iniciadores para el gen de COI está compuesto por un iniciador Sentido (forward) LCO (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG') y un Iniciador anti sentido (reverse) HCO (TAAACTTCAGGG TGACCAAA AAATCA). La temperatura de hibridación calculada y utilizada fue de 50 °C.

Por PCR, se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb) para el gen COI (Fig. 06), y un fragmento de 200 pb para el gen  $\beta$ -Actina. (Fig. 07).



**Figura 06.** Amplificación por PCR del gen de referencia COI de 03 muestras de ADN extraído de branquias de *A. tuberculosa*, visualizado en gel de agarosa al 1.5 %. C+ (control positivo *C. gigas*) Ce (Control negativo de extracción de ADN) y CPCR (control negativo de PCR), M1, M2 y M3 (muestras) MP (marcador de peso molecular).



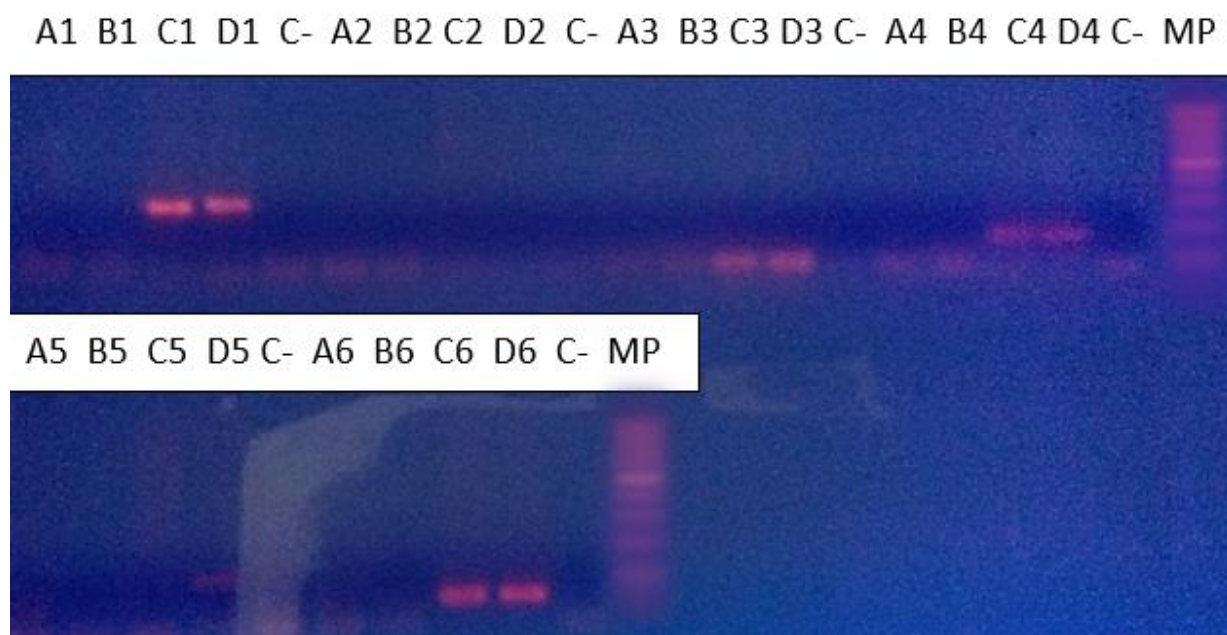
**Figura 07.** Amplificación por PCR del gen de referencia  $\beta$ -Actina de 03 muestras de ADN extraído de branquias de *A. tuberculosa*, visualizado en gel de agarosa al 1.5 %. C+ (control positivo *C. gigas*) Ce (Control negativo de extracción de ADN) y C- (control negativo de PCR), M1, M2 y M3 (muestras) MP (marcador de peso molecular).

### 3.2. EVALUACIÓN DE INICIADORES DE GENES DE INTERÉS.

Se obtuvieron secuencias de 19 juegos de iniciadores de genes implicados en la síntesis de aminoácidos libres (FAAs) que intervienen activamente en el sistema de osmorregulación en bivalvos. Las temperaturas de hibridación fueron estandarizadas a partir del T<sub>m</sub> de cada iniciador, mediante la evaluación *in silico* (Primer3) y optimizado *in vitro* en laboratorio mediante observación de la intensidad de bandas en gel de agarosa.

Se observaron bandas que corresponden a la amplificación por PCR de los genes de interés únicamente en las muestras correspondientes a los controles positivos (ADN de *C. gigas*); en cuanto a las muestras de ADN del molusco *A. tuberculosa* no se logró observar bandas correspondientes a las regiones de los genes probados. En la figura 08 se visualizaron la amplificación de regiones de ADN correspondientes a los genes Glycine dehidrogenase, Spermidine sintasa, Aldehyde deshidrogenase, ATP grasp, Cysteina sulfinica, Bomba de Na<sup>+</sup> y Cl.

En la Tabla 01 se detallan algunas características de los diecinueve juegos de iniciadores diseñados relacionados a la osmorregulación; la secuencia de nucleótidos, el tamaño en pares de bases (pb) así como, la temperatura de hibridación que se aplicó para la PCR y el número de veces probados tanto en el ADN de *A. tuberculosa* como en *C. gigas* (control positivo).



**Figura 08.** Visualización en gel de agarosa al 1.5% de ampliaciones obtenidos por PCR simple de genes de interés que intervienen en el sistema de osmorregulación de bivalvos. Utilizando como controles positivos ADN de *C. gigas* (C y D) y muestras (A y B). (1) Glycine dehidrogenase (2) Spermidine sintasa (3) Aldehyde deshidrogenase (4) ATP grasp (5) Cysteina sulfinica (6) Bomba de Na<sup>+</sup> y Cl. Y MP: marcador de peso molecular.

**Tabla 01.** Evaluación de los iniciadores diseñados dirigidos a genes involucrados en la osmorregulación de bivalvos a diferentes temperaturas de hibridación.

Primer	Secuencia	Longitud	C° Prueba 1	<i>A. tuberculosa</i>	<i>C. gigas</i>	C° Prueba 2	<i>A. tuberculosis</i>	<i>C. gigas</i>
Aminomethyltransferase-F	GGCCGGTCTGTTTGATGTC	19	56°C	Negativo	Positivo leve	54°C	Negativo	Negativo
Aminomethyltransferase-R	CCTCCCCGTTTCATTGGTAAA	22						
Glycine dehydrogenase-F	AGAGGACCTAAGGGAACTTTT GC	23	58°C	Negativo	Positivo fuerte			
Glycine dehydrogenase-R	GGGGAATCATCGAGTGAACC AG	23						
Glycine hydroxymethyltransferase-F	AAGGTCAGCCAGGCCAAAG	19	56°C	Negativo	Negativo	54°C	Negativo	Positivo leve
Glycine hydroxymethyltransferase-R	CCATTCTTCAGGGGACAACC	20						
$\Delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate synthase-F	AAGACTTACAGGGGCTCACC G	21	56°C	Negativo	Negativo	54°C	Negativo	positivo leve
$\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase-R	GATCAGGTGCTTCTGATTGGG T	22						
$\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase-F	CTGGACGCTGTGACGGGACT	20	55°C	Negativo	Negativo	56°C	Negativo	Positivo medio

Δ 1 -pyrroline-5-carboxylate reductase-R	TCTGGGCGGCTAATTTTGTG	20	56°C	Negativo	Positivo leve				
Ornithine aminotransferase-F	GCCCTTACATGCCTGGCTAC	20							
Ornithine aminotransferase-R	ACCACAACACCTGCCTCTCC	20							
Arginase-F	ATGCGTGGACATAGCAGAAGT AA	23	56°C	Negativo	Negativo	54°C	Negativo	Positivo medio	
Arginase-R	GTCGGGATTGGGATTTGGTAA	21							
Alanine transaminase-F	ATGATGACTGGCAAGGACGG	20	56°C	Negativo	Positivo leve				
Alanine transaminase-R	GACAAGAGCCCTGGGGATAC A	21							
Alanine-glyoxylate transaminase- F2	CGGAGCGAGCCCTTACCT	18	56°C	Negativo	Positivo leve				
Alanine-glyoxylate transaminase- R2	TCCTTTGGCATTGAAAATCTG A	22							
Glutamate decarboxylase-F1	TGAAGCTGTGGATCATGTGG	20	56°C	Negativo	Positivo medio				
Glutamate decarboxylase-R1	CTCGAATCCCTCCCTCTCCT	20							
Glutamate decarboxylase-F2	AGACTCACGCACTTCGGTTG	20	56°C	Negativo	Positivo fuerte				
Glutamate decarboxylase-R2	CGCATCTGTTCGTTTCGTTT	20							

Spermidine synthase-F	ATTGTCTGCTGTCAAGGGGAG T	22	56°C	Negativo	Positivo fuerte					
Spermidine synthase-R	GGGGTAGGTGGGTATTGTGG T	21								
Aldehyde dehydrogenase-F	GTTGCGATAAGATAACCCACCC T	22	56°C	Negativo	Positivo medio					
Aldehyde dehydrogenase-R	AGAACCCGAACCAGGAAAGA A	22								
ATP-grasp domain-containing protein-F	TGCCATCTTGTCTGCCAAAGG	21	56°C	Negativo	Positivo leve					
ATP-grasp domain-containing protein-R	GCACGCACATGACTCCCATC	20								
Cysteine sulfinic acid decarboxylase-F1	CAATGCTGCCTACCTGTTCC	20	56°C	Negativo	Positivo medio	52°C	Negativo	Positivo leve		
Cysteine sulfinic acid decarboxylase-R1	CAAAGCCCTGATCTCCCTTG	20								
Cysteine sulfinic acid decarboxylase-F2	AGCGTGAAAGTTGCCCATCC	20	56°C	Negativo	Positivo medio					
Cysteine sulfinic acid decarboxylase-R2	CAGGGAGAACACAGGGGACA	20								
Taurine transporter-F	CTCCCTGGAAAGGCAAAGTCT	21	56°C	Negativo	Positivo fuerte	52°C	Negativo	Positivo media		
Taurine transporter-R	GCTTTGTGAATGGCATCTTGA A	21								



HSP beta 1-F	TCGACCGTGAATTGGGTAGAA T	22	56°C	Negativo	Positivo leve	52°C	Negativo	Positivo media
HSP beta 1-R	GAGCCCTCCTCGTGTTTGG	18						
Sodium- and chloride-dependent glycine transporter-F	GCCATGCTGGGGAAAAGG	18	56°C	Negativo	Positivo fuerte			
Sodium- and chloride-dependent glycine transporter-R	GTCTGTCCATCAAGTTCGGGT T	22						

---

**Tabla 02.** Descripción y número de acceso de las secuencias usadas en el diseño de iniciadores.

PRIMER	DESCRIPCIÓN	NÚMERO DE ACCESO
Aminomethyltransferase	PREDICTED: Crassostrea gigas aminomethyltransferase, mitochondrial-like (LOC105333231), mRNA	XM_011436102.1
	PREDICTED: Crassostrea gigas SLAIN motif-containing protein 2 (LOC105339135), transcript variant X2, mRNA	XM_011444551.2
	PREDICTED: Crassostrea gigas SLAIN motif-containing protein 2 (LOC105339135), transcript variant X1, mRNA	XM_011444550.2
	PREDICTED: Biomphalaria glabrata uncharacterized protein DDB_G0283697-like (LOC106055912), mRNA	XM_013212404.1
	Crassostrea gigas clone CG_Ba133H22, complete sequence	GU207409.1
	PREDICTED: Crassostrea gigas aminomethyltransferase, mitochondrial-like (LOC105333231), mRNA	XM_011436102.1
	PREDICTED: Mizuhopecten yessoensis neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-10-like (LOC110460169), transcript variant X1, mRNA	XM_021512924.1
	PREDICTED: Crassostrea virginica proyl 4-hydroxylase subunit alpha-3-like (LOC111125535), transcript variant X3, mRNA	XM_022469455.1
Glycine dehydrogenase	Crassostrea gigas glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial (LOC105333668), transcript variant X2, mRNA	XM_020069476.1

Glycine hydroxymethyltransferase	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial (LOC105333668), transcript variant X1, mRNA	XM_020069475.1
	PREDICTED: <i>Biomphalaria glabrata</i> cAMP-regulated D2 protein-like (LOC106061725), mRNA	XM_013219927.1
	PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial-like (LOC106880430), mRNA	XM_014930346.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> serine hydroxymethyltransferase, cytosolic (LOC105333843), mRNA	XM_011437051.2
	PREDICTED: <i>Pomacea canaliculata</i> serine hydroxymethyltransferase, cytosolic-like (LOC112562548), mRNA	XM_025235844.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> serine hydroxymethyltransferase, cytosolic (LOC105333843), mRNA	XM_011437051.2
$\Delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate synthase	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> uncharacterized LOC105338924 (LOC105338924), mRNA	XM_020071665.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> probable delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (LOC111135840), mRNA	XM_022486240.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> probable delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase(LOC111135839), transcript variant X6, mRNA	XM_022486239.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> probable delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase(LOC111135839), transcript variant X5, mRNA	XM_022486238.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> probable delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase(LOC111135839), transcript variant X4, mRNA	XM_022486237.1

	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (LOC105348527), mRNA	XM_020062436.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> uncharacterized LOC105328813 (LOC105328813), mRNA	XM_011429832.2
	PREDICTED: <i>Pomacea canaliculata</i> homeobox protein engrailed-1-like (LOC112560137), mRNA	XM_025231731.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111137602 (LOC111137602), transcript variant X5, mRNA	XM_022489130.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111137602 (LOC111137602), transcript variant X4, mRNA	XM_022489129.1
	<i>Crassostrea virginica</i> isolate RU13XGHG1-28 chromosome 1, C_virginica-3.0, whole genome shotgun sequence	NC_035780.1
Δ 1 -pyrroline-5-carboxylate reductase	Candidatus <i>Vesicomysocius okutanii</i> HA DNA, complete genome	NC_009465.1
	Candidatus <i>Vesicomysocius okutanii</i> HA DNA, complete genome	AP009247.1
	Mizuhopecten yessoensis strain PY_sf001 unplaced genomic scaffold, ASM211388v2 scaffold716351, whole genome shotgun sequence	NW_018480073.1
Ornithine aminotransferase	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> ornithine aminotransferase, mitochondrial (LOC105332912), transcript variant X2, mRNA	XM_020069175.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> ornithine aminotransferase, mitochondrial (LOC105332912), transcript variant X1, mRNA	XM_020069174.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> ornithine aminotransferase, mitochondrial (LOC105328238), mRNA	XM_011429018.2

	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111105576 (LOC111105576), transcript variant X1, mRNA	XM_022439933.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111105408 (LOC111105408), transcript variant X2, mRNA	XM_022439692.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111105408 (LOC111105408), transcript variant X1, mRNA	XM_022439691.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111104620 (LOC111104620), mRNA	XM_022438643.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> arginase, hepatic (LOC105339545), mRNA	XM_011445123.2
Arginasa	PREDICTED: <i>Pomacea canaliculata</i> cytoplasmic polyadenylation element-binding protein-like (LOC112572193), mRNA	XM_025251762.1
	PREDICTED: <i>Biomphalaria glabrata</i> uncharacterized LOC106059356 (LOC106059356), mRNA	XM_013216939.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> arginase, hepatic-like (LOC111130969), mRNA	XM_022478277.1
Alanine transaminase	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> alanine aminotransferase 1 (LOC105330743), transcript variant X2, mRNA	XM_020068308.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> alanine aminotransferase 1 (LOC105330743), transcript variant X1, mRNA	XM_011432640.2
	<i>Crassostrea gigas</i> clone uscCgi-211 microsatellite sequence	AY999709.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> alanine aminotransferase 1 (LOC105330743), transcript variant X2, mRNA	XM_020068308.1

Alanine-glyoxylate transaminase	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> alanine aminotransferase 1 (LOC105330743), transcript variant X1, mRNA	XM_011432640.2
	PREDICTED: <i>Aplysia californica</i> uncharacterized LOC101849887 (LOC101849887), mRNA	XM_005109936.2
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> alanine--glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial (LOC105338391), mRNA	XM_011443494.2
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111107955 (LOC111107955), transcript variant X5, ncRNA	XR_002635483.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111107955 (LOC111107955), transcript variant X4, ncRNA	XR_002635482.1
Glutamate decarboxylase	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111107955 (LOC111107955), transcript variant X3, ncRNA	XR_002635481.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111107955 (LOC111107955), transcript variant X2, ncRNA	XR_002635480.1
	PREDICTED: <i>Pomacea canaliculata</i> glutamate decarboxylase 1-like (LOC112556020), mRNA	XM_025224630.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> glutamate decarboxylase 1-like (LOC111122875), transcript variant X4, mRNA	XM_022464892.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> glutamate decarboxylase 1-like (LOC111122875), transcript variant X3, mRNA	XM_22464891.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> glutamate decarboxylase 1-like (LOC111122875), transcript variant X2, mRNA	XM_022464889.1

Spermidine synthase	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> glutamate decarboxylase 1-like (LOC111122875), transcript variant X1, mRNA	XM_021506843.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> spermidine synthase (LOC105330110), mRNA	XM_011431699.2
	PREDICTED: <i>Pomacea canaliculata</i> uncharacterized LOC112566892 (LOC112566892), transcript variant X4, mRNA	XM_025243313.1
	PREDICTED: <i>Pomacea canaliculata</i> uncharacterized LOC112566892 (LOC112566892), transcript variant X3, mRNA	XM_025243312.1
	PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> homer protein homolog 2-like (LOC106870788), transcript variant X3, mRNA	XM_014916990.1
	PREDICTED: <i>Pomacea canaliculata</i> pericentrin-like (LOC112559747), mRNA	XM_025231130.1
Aldehyde dehydrogenase	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111137737 (LOC111137737), mRNA	XM_022489365.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> aldehyde dehydrogenase family 3 member B1 (LOC105330234), transcript variant X6, mRNA	XM_020068076.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> aldehyde dehydrogenase family 3 member B1 (LOC105330234), transcript variant X5, mRNA	XM_020068075.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> aldehyde dehydrogenase family 3 member B1 (LOC105330234), transcript variant X4, mRNA	XM_020068074.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> aldehyde dehydrogenase family 3 member B1 (LOC105330234), transcript variant X3, mRNA	XM_020068073.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> aldehyde dehydrogenase family 3 member B1-like (LOC111134997), transcript variant X3, misc_RNA	XR_002639550.1

	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> aldehyde dehydrogenase family 3 member B1-like (LOC111134997), transcript variant X2, mRNA	XM_022484654.1
ATP-grasp domain-containing protein	TPA_inf: <i>Crassostrea virginica</i> carnosine synthase-like protein mRNA, complete cds	BK007044.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111116640 (LOC111116640), mRNA	XM_022455643.1
Cysteine sulfinic acid decarboxylase	<i>Crassostrea gigas</i> cysteine sulfinic acid decarboxylase 2 (CSAD2) mRNA, complete cds	KY418037.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> cysteine sulfinic acid decarboxylase (LOC105338879), transcript variant X2, mRNA	XM_020071668.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> cysteine sulfinic acid decarboxylase (LOC105338879), transcript variant X1, mRNA	XM_011444167.2
	PREDICTED: <i>Crassostrea virginica</i> uncharacterized LOC111113107 (LOC111113107), transcript variant X3, ncRNA	XR_002636463.1
	<i>Crassostrea gigas</i> cysteine sulfinic acid decarboxylase 1 (CSAD1) mRNA, complete cds	KY418036.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> cysteine sulfinic acid decarboxylase (LOC105321584), mRNA	XM_011419925.1
Taurine transporter	<i>Bathymodiolus platifrons</i> TAUT mRNA for taurine transporter, complete cds, country: Japan: Sagami Bay	AB513188.1
	<i>Bathymodiolus septemdiemum</i> TAUT mRNA for taurine transporter, complete cds	AB371309.1
	<i>Crassostrea gigas</i> taut mRNA for taurine transporter, complete cds	AB234293.1
	<i>Mytilus galloprovincialis</i> taut mRNA for taurine transporter, complete cds	AB190909.1



HSP beta 1	PREDICTED: Crassostrea gigas sodium- and chloride-dependent taurine transporter(LOC105345364), mRNA	XM_020074159.1
	PREDICTED: Crassostrea gigas sodium- and chloride-dependent taurine transporter(LOC105329948), mRNA	XM_020067950.1
	PREDICTED: Crassostrea gigas sodium- and chloride-dependent taurine transporter(LOC105325311), mRNA	XM_011424829.2
	PREDICTED: Crassostrea gigas sodium- and chloride-dependent taurine transporter(LOC105345366), mRNA	XM_011453492.2
	Crassostrea gigas sodium- and chloride-dependent taurine transporter-like (LOC105325240), mRNA	NM_001305349.1
	PREDICTED: Crassostrea gigas sodium- and chloride-dependent taurine transporter-like (LOC105325240), transcript variant X3, mRNA	XM_011424713.2
	PREDICTED: Crassostrea gigas sodium- and chloride-dependent taurine transporter-like (LOC105325240), transcript variant X2, mRNA	XM_011424712.2
	PREDICTED: Crassostrea gigas sodium- and chloride-dependent taurine transporter-like (LOC105325240), transcript variant X1, mRNA	XM_011424711.2
	PREDICTED: Crassostrea virginica sodium- and chloride-dependent taurine transporter-like (LOC111126647), mRNA	XM_022471431.1
	PREDICTED: Crassostrea gigas heat shock protein 27 (LOC105343216), mRNA	XM_011450479.2
HSP beta 1	PREDICTED: Crassostrea virginica uncharacterized LOC111123999 (LOC111123999), mRNA	XM_022466828.1
	PREDICTED: Mizuhopecten yessoensis zinc finger protein 665-like (LOC110454580), mRNA	XM_021504164.1

Sodium- and chloride- dependent glycine transporter	PREDICTED: Crassostrea gigas ATP-dependent RNA helicase DHX36-like (LOC105345676), mRNA	XM_011453897.2
	Crassostrea gigas sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1-like (LOC105337679), mRNA	NM_001305316.1
	PREDICTED: Pomacea canaliculata atlastin-2-like (LOC112570081), transcript variant X2, mRNA	XM_025248300.1
	PREDICTED: Pomacea canaliculata atlastin-2-like (LOC112570081), transcript variant X1, mRNA	XM_025248299.1
	PREDICTED: Crassostrea gigas heat shock 70 kDa protein 12A (LOC105334722), transcript variant X2, mRNA	XM_020069850.1
	PREDICTED: Crassostrea gigas heat shock 70 kDa protein 12A (LOC105334722), transcript variant X1, mRNA	XM_020069846.1

---

## IV. DISCUSIÓN

La comprensión de los mecanismos por los cuales los organismos pueden adaptarse a los desafíos ambientales y los factores que limitan sus capacidades de distribución han sido durante mucho tiempo la interrogante de la biología (Chapman, 2010). Para los organismos marinos su sobrevivencia requerirá de la aclimatación y adaptación a variantes ambientales (Doney, 2010). En un trabajo realizado por De Alburquerque (2009) en la especie estuarina *Anomalocardia brasiliana*, manifiesta que su capacidad osmorreguladora puede asociarse a sus adaptaciones fisiológicas. Para el caso del bivalvo estuarino *A. tuberculosa* una de las principales limitantes para su sobrevivencia es la baja salinidad a consecuencia de la entrada de agua dulce proveniente de los ríos en época de lluvias, por lo que la capacidad de eurialinidad es un requerimiento necesario para este molusco.

Los estudios a nivel molecular han visto siendo utilizados ampliamente para entender el desarrollo de la capacidad osmorreguladora en moluscos. A nivel de genoma, la PCR y sus variantes han sido frecuentemente utilizados desde su desarrollo por Kary Mullis en 1983, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular (Dequeker, 2009). En este trabajo se utilizó la técnica de PCR como una herramienta para la amplificación de porciones de ADN correspondientes a diecisiete genes relacionados a la osmorregulación.

En moluscos estuarinos como *Crassostrea gigas* las herramientas moleculares son utilizadas para el estudio de transcriptomas mediante tecnología de Next Generation Sequencing (NGS) (Sussarellu et al., 2010; Zhao et al., 2012; Clark et al., 2013). A diferencia de estos trabajos nosotros utilizamos para el secuenciamiento, la tecnología Sanger; y probamos ADN de *C. gigas* como control positivo por ser ampliamente referenciado.

Actualmente muchos trabajos de diversidad genética y/o genómica requieren herramientas que permiten validarlos, dentro de ellas están los marcadores moleculares (Plazzi y Passamonti, 2010; Chamorro y Rosero, 2016; Dominguez et al., 2011). Tomando como referencia estas investigaciones, en éste trabajo se propusieron como marcadores moleculares los genes  $\beta$ -Actin (fig. 07) y Citocromo Oxidasa I subunidad I (COI) (fig. 06).

El gen COI con un tamaño de 710 pb en *A. tuberculosa*, es parte de un complejo génico de proteínas transmembrana, involucradas en el transporte eléctrico y catálisis de la cadena respiratoria de organismos eucariotas y ha sido motivo de estudios poblacionales de variabilidad genética por su universalidad e importancia evolutiva (Chamorro y Rosero, 2016); como parte de nuestros resultados se amplificó una porción del gen COI (fig. 06) y al igual que los autores, obtuvimos un segmento de ADN amplificado con un tamaño aproximado de 700 pb que corresponderían a lo esperado.

El gen  $\beta$ -Actin constituye a las proteínas más abundante en la mayoría de las células eucarióticas. Es ampliamente conservado y participa en más interacciones proteína-proteína que cualquier proteína conocida (Dominguez et al., 2011). En esta investigación reportamos la amplificación de un segundo control endógeno, el gen Beta actina ( $\beta$ -actina) (fig. 07) en el ADN de *Anadara tuberculosa* con un tamaño aproximado de 200 pb. Con respecto al estudio de los mecanismos de adaptación frente a condiciones de estrés de salinidad se han realizado trabajos a nivel transcriptómico en ostra *Crassostrea gigas* que involucran mecanismos de síntesis FAAs (Amino ácidos libres) para mantener el balance osmótico frente a condiciones de baja salinidad, determinando como principales osmolitos a Taurina, Glicina, Prolina, Arginina, Alanina y Piruvato. El análisis de los genes para las enzimas involucradas en la síntesis de estos FAAs, han sido reportados como biomarcadores frente a condiciones de estrés salino en ostras (Meng et al., 2013),

En la especie *C. gigas* se reportó la sobreexpresión de Glicina, Alanina y Prolina cuando estaba expuesta a salinidades de 40 ppt permitiéndoles osmorregularse (Meng et al., 2013). En *A. tuberculosa* se ha reportado que han tolerado salinidades de hasta 40 ppt. (Nieves et al., 2009) aunque se desconocen los genes que participa en dicha osmorregulación. Debido a la carencia de base de datos para genes de interés en *A. tuberculosa*, se evaluaron los genes reportados previamente en la ostra *C. gigas*; en la tabla 01 se muestran los genes que fueron seleccionados de la bibliografía anterior así como de trabajos como Hawkins y Hilbish (1992) o Gosling (2015).

Para este trabajo se utilizaron secuencias de genes homólogos de otros molusco como *Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, etc.; que si bien es cierto son filogenéticamente distantes a *A. tuberculosa*; cabe resaltar que, al igual que *A. tuberculosa* ambas son especies de habitats intermareales y para el caso de *C. gigas* de ambientes estuarinos. Así también ambas son reportadas como organismos eurhialinos; en el caso de *M. edulis* se encuentra en aguas marinas y salobre de 4 ‰, aunque no crece en salinidades inferiores a 15 ‰ y su tasa de crecimiento se reduce debajo de 18 ‰. Para *C. gigas* el rango óptimo de salinidad oscila entre 20 y 25 ‰, aunque la especie puede aparecer en salinidades inferiores a 10 ‰ y sobrevivirá a salinidades superiores a 35 ‰, donde es poco probable que se reproduzca (FAO, 2018). Para el caso de *A. tuberculosa* que es propia de ambientes estuarinos donde la salinidad no sobrepasa los 35 ‰ (Montero, P. 2013). y se reporta un mínimo de 18 ‰ (Ordinola E. et. al., 2010).

Se seleccionaron un total de 17 genes para lo cual se diseñaron 19 juegos de iniciadores; sin embargo, en nuestra investigación no se logró la amplificación de las secuencias por PCR (fig. 08). Uno de los posibles motivos por los cuales los iniciadores no lograron amplificar es que fueron diseñados a partir de las secuencias de ADN de otras especies de moluscos y no tomando como base ADN de *A. Tuberculosa*. Otra

posible razón pudiera ser la alta tasa de mutación presente en la especie *A. tuberculosa* que Saavedra y Andrés (2015) reportan al amplificar cinco microsatélites; la idea de la mutación en este bivalvo pudiera ser reforzada en la premisa de que los organismos marinos como los moluscos producen gran cantidad de gametos y por lo tanto mayor cantidad de ciclos celulares lo que puede a su vez incrementar la posibilidad de mutación.

Al carecer *A. tuberculosa* de los genes que son ampliamente reportados en ostra y otros moluscos eurihalinos, podemos encontrar una explicación en la filogenia moderna. Plazzi y Passamonti (2010) con su trabajo basado en el estudio del ADN de diversos moluscos afirma que la familia Arcidae a la que pertenece *A. tuberculosa*, se desarrolla a final del periodo Ordoviciano aproximadamente con una antigüedad de 443 millones de años; mientras que la familia Ostreidae a la que pertenece *C. gigas* en el periodo Permiano de 251 millones de años. la distancia filogenética de estas especies nos permiten entender la variedad y diferencias evolutivas de las adaptaciones, por lo que es entendible que la especie modelo *A. tuberculosa* haya desarrollado adaptaciones diferentes a las del control positivo *C. gigas* y por tanto los genes involucrados en su osmorregulación sean posiblemente otros.

En los trabajos génicos en que se desarrollan técnicas como PCR o sus variantes es necesario que se contemplen aspectos como los inhibidores de la técnica, como la presencia de alcohol y melanina. Un aditivo que se suele usar en la optimización de la PCR es la albumina de suero bovino (BSA) que permite estabilizar la enzima polimerasa y disminuye el efecto de la melanina (Ouyang et al., 2015). En nuestro trabajo nos fue necesario optimizar la técnica PCR para las muestras de ADN de *A. tuberculosa*, adicionando al mix de PCR una concentración de 1 mg/mL de BSA con el fin de obtener una banda mejor definida como consecuencia de una mejor amplificación; y en

ocasiones probando con dos temperaturas de hibridación de los iniciadores tal como se muestra en la tabla 01.

## V. CONCLUSIONES

Mediante la técnica PCR convencional no fue posible la amplificación de las secuencias de interés en las muestras de ADN de *A. tuberculosa*, a partir de iniciadores sintetizados para los principales transcritos que intervienen en la síntesis de los FAAs.



## VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la investigación presente abarcando mejores tecnologías que permitan llenar el vacío respecto a los transcritos involucrados al mecanismo de osmorregulación en el molusco *Anadara tuberculosa*. Como alternativa se proponen trabajos en proteómica.

En trabajos posteriores se recomienda realizar ensayos con las muestras de individuos sometidos primero a distintas salinidades y sean evaluadas con los mismos iniciadores para corroborar nuestros resultados.

Se recomienda agenciarnos de más juegos de iniciadores, que pudieran ser probados por PCR.

Se recomienda que en el futuro realizar diluciones del ADN para obtener una mejor definición en las bandas amplificadas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Chamorro, E., & Rosero, C. (2016). Estimación de la diversidad genética de *Anadara tuberculosa* en cinco manglares de Tumaco, utilizando la enzima citocromo oxidasa I. *Revista MVZ Córdoba*, 21(3), 5547-5557.
- Chapman, R. W., Mancía, A., Beal, M., Veloso, A., Rathburn, C., Blair, A., ... & Wirth, E. F. (2011). The transcriptomic responses of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to environmental conditions. *Molecular Ecology*, 20(7), 1431-1449.
- Clark, M. S., Thorne, M. A., Amaral, A., Vieira, F., Batista, F. M., Reis, J., & Power, D. M. (2013). Identification of molecular and physiological responses to chronic environmental challenge in an invasive species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecology and evolution*, 3(10), 3283-3297.
- Cross, I., Merlo, M. A., Rodríguez, M. E., Portela-Bens, S., & Rebordinos, L. (2014). Adaptation to abiotic stress in the oyster *Crassostrea angulata* relays on genetic polymorphisms. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 618-624.
- Cruz, R. A., Rodríguez, C. F., & Chavarría-Solera, F. (2012). Comparación de la composición química proximal de la carne de *Anadara tuberculosa* y *A. similis* (Bivalvia: Arcidae) de Chomes, Puntarenas, Costa Rica. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 4, 95-103.
- Cultured Aquatic Species Information Programme. *Mytilus edulis*. Cultured Aquatic Species Information Programme. **Text by Goulletquer, P.** In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 1 January 2004. [Cited 17 September 2018].
- Dequeker, E., Stuhmann, M., Morris, M. A., Casals, T., Castellani, C., Claustres, M., ... & Pignatti, P. F. (2009). Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of

- cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *European Journal of Human Genetics*, 17(1), 51.
- Dickinson, G. H., Ivanina, A. V., Matoo, O. B., Pörtner, H. O., Lannig, G., Bock, C., ... & Sokolova, I. M. (2012). Interactive effects of salinity and elevated CO<sub>2</sub> levels on juvenile eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of Experimental Biology*, 215(1), 29-43.
- Diringer, B., Mialhe, E., Motte, E 2009. Desarrollo de metodologías para la reproducción y larvicultura de la Concha Negra (*Anadara tuberculosa*), destinada a operaciones de repoblación en el Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes y engorde en cultivo. FINCyT.
- Diringer, B., Vasquez R., Moreno V., Pretell K., Sahuquet M., (2012). Peru Project Studies Blood Cockles For Stock Enhancement, Aquaculture. The Global Aquaculture Advocate; Ju-Aout 2012, pp.48-50.
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annual review of biophysics*, 40, 169-186.
- Doney, S. C. (2010). The growing human footprint on coastal and open-ocean biogeochemistry. *science*, 328(5985), 1512-1516.
- Eierman, L. E., & Hare, M. P. (2014). Transcriptomic analysis of candidate osmoregulatory genes in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *BMC genomics*, 15(1), 503.
- Espinosa, S., Delgado, M. F., Orobio, B., Mejía-Ladino, L., & Gil-Agudelo, D. (2010). Estado de la población y valoración de algunas estrategias de conservación del recurso piangua *Anadara tuberculosa* (Sowerby) en sectores de Bazán y Nerete, costa pacífica nariñense de Colombia. *Bol. Invest. Mar. Cost*, 39(1), 161-176.
- LA ACUICULTURA, Y. EL ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA.

- Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(5), 294-9.
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., & Renault, T. (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(4), 536-547.
- Giorgio, E. M., Chaneton, B. J., & Zapata, P. D. (2009). Optimización de la amplificación mediante PCR de la región promotora 1 del gen shp-1 luego de su tratamiento con bisulfito. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (12), 04-08.
- Gosling, E. (2015). *Marine bivalve molluscs*. John Wiley & Sons.
- Gracey, A. Y., Chaney, M. L., Boomhower, J. P., Tyburczy, W. R., Connor, K., & Somero, G. N. (2008). Rhythms of gene expression in a fluctuating intertidal environment. *Current Biology*, 18(19), 1501-1507.
- Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142(1), 3-16.
- Hawkins, A. J. S., & Hilbish, T. J. (1992). The costs of cell volume regulation: protein metabolism during hyperosmotic adjustment. *Journal of the marine biological association of the united kingdom*, 72(3), 569-578.
- Hofmann, G. E., & Place, S. P. (2007). Genomics-enabled research in marine ecology: challenges, risks and pay-offs. *Marine Ecology Progress Series*, 332, 249-255.
- Lacoste, A., Malham, S. K., Cueff, A., & Poulet, S. A. (2001). Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *General and comparative endocrinology*, 122(2), 181-188.
- Liu, L., Cao, F., Wang, S., Zhou, J., Yang, G., & Wang, C. (2015). Detection of malignant B lymphocytes by PCR clonality assay using direct lysis of cerebrospinal fluid and

- low volume specimens. *International journal of laboratory hematology*, 37(2), 165-173.
- Lucero, C., Cantera, J., & Neira, R. (2012). Pesquería y crecimiento de la piangua (Arcoida: Arcidae) *Anadara tuberculosa* en la Bahía de Málaga del Pacífico colombiano, 2005-2007. *Revista de Biología Tropical*, 60(1).
- Mauk, M. G., Bau, H. H., Malamud, D., & Abrams, W. (2016). *U.S. Patent No. 9,409,166*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Mendoza, O., & Peralta, T. (2004). Primeros ensayos sobre reproducción inducida y obtención de semillas de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) en laboratorio. *Revista Manglar*, 2(1), 87-94.
- Meng, J., Zhu, Q., Zhang, L., Li, C., Li, L., She, Z., ... & Zhang, G. (2013). Genome and transcriptome analyses provide insight into the euryhaline adaptation mechanism of *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 8(3), e58563.
- Naranjo, E., Otero, A., & Martínez-Zubiaur, Y. (2013). Optimización de la amplificación por PCR del gen de la endoglucanasa de *Ralstonia solanacearum*. *Revista de Protección Vegetal*, 28(3), 211-214.
- Nieves, M., Román, J. C., Piña, P., Medina, A., Leal, S., Miranda, A., & Muñoz, G. (2009). Balance energético de *Anadara tuberculosa* (SOWERBY, 1833) a diferentes temperaturas. *Revista de Investigaciones Marinas*, 30, 135-144.
- Ordinola, E., Montero, P., Alemán, S., & Llanos, J. (2007). Prospección del recurso concha negra (*Anadara tuberculosa*) en los manglares de Tumbes. *Tumbes: IMARPE*.
- Pérez de Castro, A. M. (2010). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). *Valencia: Universidad Politécnica de Valencia*.

- Plazzi, F., & Passamonti, M. (2010). Towards a molecular phylogeny of Mollusks: Bivalves' early evolution as revealed by mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 641-657.
- Saavedra, G., & Andrés, J. (2015). *Identificación de microsatélites polimórficos por ampliación cruzada en Anadara similes (mollusca: Arcidae) [recurso electrónico]* (Doctoral dissertation).
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., & Moraga, D. (2010). Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Marine genomics*, 3(3), 133-143.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., ... & Xiong, Z. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490(7418), 49.
- Zhao, X., Yu, H., Kong, L., & Li, Q. (2012). Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PloS one*, 7(9), e46244.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1

**Tabla 03.** Secuencias de péptidos de interés obtenido mediante MALDI TOF TOF en muestras a tres salinidades 5, 15 y 25 ppt.

Prec m/z	Salinidad	Secuencia	Proteína putativa	ID	Tipo
634.4255	0 ppt	VSITSK	actin-binding protein anillin-like isoform X4	XP_011432719.1	Presencial
861.2562	0ppt	DPVLFNR	cytochrome c oxidase subunit I	ACJ71251.1	Presencial
634.4355	ppt	WLTSK	sn1-specific diacylglycerol lipase beta-like isoform X1	XP_011456479.1	Presencial
642.6835	0 ppt	GHLCR	secretin receptor-like	XP_011443258.1	diferencial 0 y 5ppt
634.4438	o ppt	WVDSK	Beta-1,3-glucan-binding protein	EKC31576.1	diferencial 0 y 5ppt
650.1957	0 ppt	TTLTSK	: Integumentary mucin C.1-like	XP_011448401.1	diferencial 0 y 5ppt
642.7064	ppt	LPPCR	General transcription factor 3C polypeptide 5 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-like	EKC18757.1	presencial
861.2562	o ppt	NPIDFVR		XP_011412614.1	presencial
1276.9617	ppt	VLKKPKFDFR	40S ribosomal protein S3a	EKC30815.1	presencial
861.2705	ppt	QTSKMR	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase-like protein A	EKC32655.1	presencial
642.7028	0ppt	CFTSK	Synaptobrevin, partial	EKC41410.1	diferencial 0 y 5ppt
630.6775	0ppt	VVVVSK	cytochrome b-245 heavy chain-like, partial	XP_011415130.1	presencial
634.4438	0ppt	GELTSK	chloride channel protein 2-like isoform X2 adenosylmethionine synthase isoform type-2-like isoform X3	XP_011444741.1	presencial
634.4752	0 ppt	EITSK		XP_011434283.1	presencial
634.4255	o ppt	GQITSK	glycine N-acyltransferase-like EF-hand calcium-binding domain-containing protein 6-like isoform X3	XP_011429712.1	presencial
642.6721	0ppt	HGITSK		XP_011440150.1	diferencial 0 y 5ppt
634.4596	0ppt	DADVSK	trichohyalin-like	XP_011428458.1	diferencial 0 y 5ppt
861.2562	0ppt	ETVFDLR	multidrug resistance-associated protein 4-like	XP_011440597.1	diferencial 0 y 5ppt
634.4255	0ppt	ELTSK	Tripartite motif-containing protein 3	EKC24347.1	diferencial 0 y 5ppt
877.2007	ppt	GIGCEWR	Krueppel-like factor 5	EKC18851.1	presencial
634.4355	ppt	LEGTNT	heat shock 70 kDa protein 12A-like	XP_011418487.1	presencial
634.4404	oppt	EGLTSK	Uncharacterized protein C7orf58	EKC39469.1	presencial
650.1859	oppt	AMVDTN	Rotatin	EKC36303.1	diferencial 0 y 5ppt
1277.969	ppt	LVAVRDVPRPR	gelsolin-like protein, partial	AFJ91781.1	presencial
634.4255	0ppt	VSLTSK	pyruvate kinase	CAJ28914.2	diferencial 0 y 5ppt
642.685	o ppt	HGLCR	Serine/threonine-protein kinase SRPK1	EKC30837.1	presencial

## **Anexo 2**

### **PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE PROTEINAS**

1. Se parte de la mitad del tejido branquial, la cual se lava dos veces con 500 µl de agua grado HPLC, homogenizando antes de cada lavado en vórtex.
2. Macerar de 3 a 5 minutos en seco.
3. Macerar sobre hielo de 4 a 5 minutos con 100 µl de buffer de Rehidratación
4. Se homogeniza en vórtex por 30 segundos y luego se sónica por 1 minuto.
5. Incubar 2 horas a -20°C.
6. Centrifugar por 20 minutos a 20 000g o 14 000 rpm a 4°C
7. Se recupera el sobrenadante
8. Al sobrenadante se le agrega 4 volúmenes de acetona helada al 80% o 3 volúmenes de 10% de TCA
9. Se incuba a -20°C por 2 horas
10. Se centrifuga a 20 000g o 14rpm por 20 minutos.
11. Se elimina el sobrenadante y el pellet se re suspende en 30 µl de buffer de rehidratación.



### **Anexo 3**

#### **EXTRACCIÓN DE ADN DE BRANQUIAS DE MOLUSCOS POR METODO BROMURO TRIMETIL AMONIO DE CETILO (CTAB)**

1. Colocar 0.1 gr de branquias del molusco en un tubo
2. Lavar el tejido con sol. Salina 2%
3. Triturar el tejido y agregar 700 µl de CTAB lisis (100 mM-tris HCl pH 8; 1.4M NaCl; EDTA 20mM; CTAB 2%) ----- se puede agregar el CTAB en dos partes para triturar mejor.
4. Agregar 5 µl de proteínasa K. 20 mg/ml----- vortexear
5. Incubar a 55 °C por 2 horas ---- vortexear c/20 minutos
6. Colocar en 1 volumen final igual fenol: cloroformo : alcohol isoamil (25:24:1)
7. Homogenizar la muestra vigorosamente y centrifugar a 10 000 rpm por 5 min.
8. Recuperar el sobrenadante y agregar 2V de etanol absoluto helado, también puede ser de 96%.
9. Incubar a -20 °C por 30 min
10. Centrifugar a 10 000 rpm por 10 min.
11. Eliminar el sobrenadante y colocar 500 µl de etanol al 75%
12. Centrifugar a 10 000 rpm por 5 min.
13. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet por 10 min. A temperatura ambiente
14. Re suspender el pellet en 50 µl de TE pH 8 (10 mM tris HCl pH 8; 1 mM EDTA)
15. Agregar 1 µl de ARNasa 10mg/ml e incubar a 65°C por 10 min.
16. Guardar el ADN a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

## Anexo 4

### GALERIA DE FOTOS



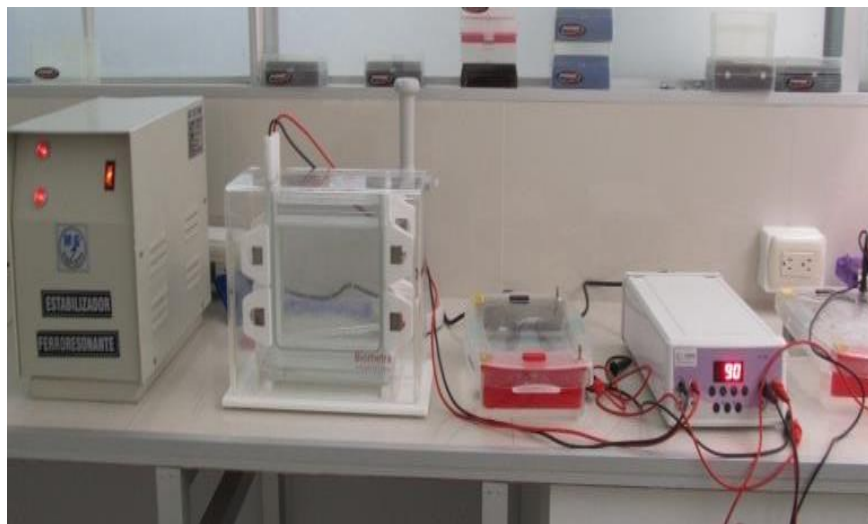
**Figura 09.** Material empleado para la extracción de ADN de branquias de *Anadara tuberculosa*.



**Figura 10.** Extracción de ADN de branquias de *Anadara tuberculosa*.



**Figura 11.** Material empleado para la extracción de proteínas de branquias de *Anadara tuberculosa*.



**Figura 12.** Electroforesis de las proteínas recuperadas.

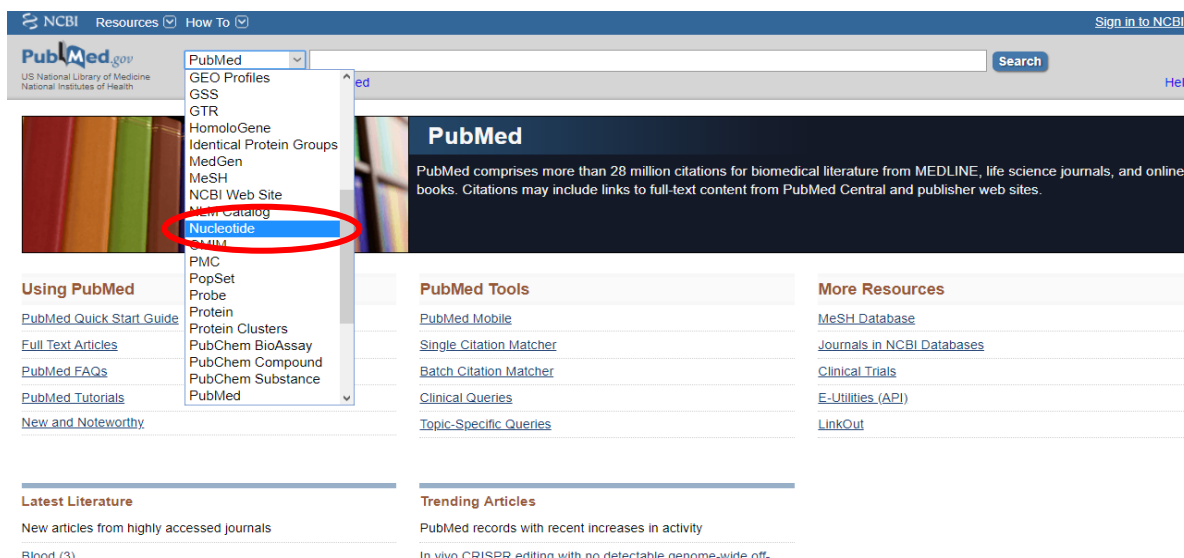


**Figura 13.** Espectrómetro de masas 4800 MALDI TOF-MS empleado para el análisis de proteínas.

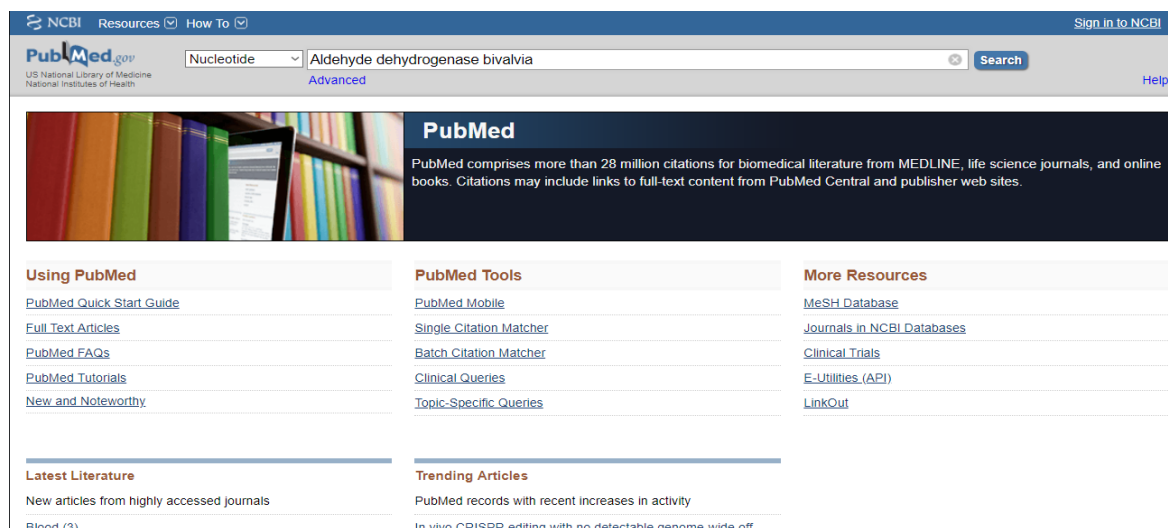
## Anexo 5

### PASOS PARA EL DISEÑO DE INICIADOR

1. Seleccionar la opción Nucleotide de la base de datos PUBMED (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)



2. Búsqueda del gen de interés en PUBMED



### 3. Seleccionar las secuencias de interés

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Aldehyde dehydrogenase family 3 bivalvia Search

Create alert Advanced Help

Learn more about upcoming changes to the Nucleotide, EST, and GSS databases.

Species Summary 20 per page Sort by Default order Send to: Filters: Manage Filters

Animals (32)  
Bacteria (11)  
Customize ...

Molecule types  
genomic DNA/RNA (34)  
mRNA (8)  
Customize ...

Source databases  
INSDC (GenBank) (32)  
RefSeq (11)  
Customize ...

Sequence length  
Custom range...

Release date  
Custom range...

Revision date  
Custom range...

Items: 1 to 20 of 43  
Selected: 4  
1. ☐ [Crassostrea virginica isolate RU13XGHG1-28 chromosome 1, C. virginica 3.0, whole genome shotgun sequence](#)  
65,668,440 bp linear DNA  
Accession: NC\_035780.1 GI: 1240176741  
Assembly BioProject BioSample Protein Taxonomy  
GenBank FASTA Graphics

2. ☐ [Crassostrea gigas unplaced genomic scaffold scaffold1032, whole genome shotgun sequence](#)  
712,755 bp linear DNA  
Accession: JH816740.1 GI: 405965376  
Assembly BioProject BioSample Protein PubMed Taxonomy  
GenBank FASTA Graphics

3. ☐ [Gamma proteobacterium symbiont of Ctena orbiculata isolate LUC\\_16\\_020\\_40\\_C\\_14, whole genome shotgun sequence](#)

Results by taxon  
Top Organisms [Tree]  
Crassostrea gigas (20)  
gamma proteobacterium symbiont of Ctena orbiculata (11)  
Mizuhopecten yessoensis (8)  
Crassostrea virginica (4)

Find related data  
Database: Select  
Find items

Search details  
aldehyde dehydrogenase[All Fields] AND  
family[All Fields] AND 3[All Fields]  
AND ("Bivalvia"[Organism] OR

☒ [PREDICTED: Crassostrea gigas aldehyde dehydrogenase family 3 member B1](#)

14. [\(LOC105330234\), transcript variant X6, mRNA](#)

1,653 bp linear mRNA

Accession: XM\_020068076.1 GI: 1139805362

[BioProject](#) [Protein](#) [Taxonomy](#)

[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

☒ [PREDICTED: Crassostrea gigas aldehyde dehydrogenase family 3 member B1](#)

15. [\(LOC105330234\), transcript variant X5, mRNA](#)

2,161 bp linear mRNA

Accession: XM\_020068075.1 GI: 1139805360

[BioProject](#) [Protein](#) [Taxonomy](#)

[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

☒ [PREDICTED: Crassostrea gigas aldehyde dehydrogenase family 3 member B1](#)

16. [\(LOC105330234\), transcript variant X4, mRNA](#)

1,671 bp linear mRNA

Accession: XM\_020068074.1 GI: 1139805358

[BioProject](#) [Protein](#) [Taxonomy](#)

[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

☒ [PREDICTED: Crassostrea gigas aldehyde dehydrogenase family 3 member B1](#)

17. [\(LOC105330234\), transcript variant X3, mRNA](#)

2,168 bp linear mRNA

Accession: XM\_020068073.1 GI: 1139805356

[BioProject](#) [Protein](#) [Taxonomy](#)

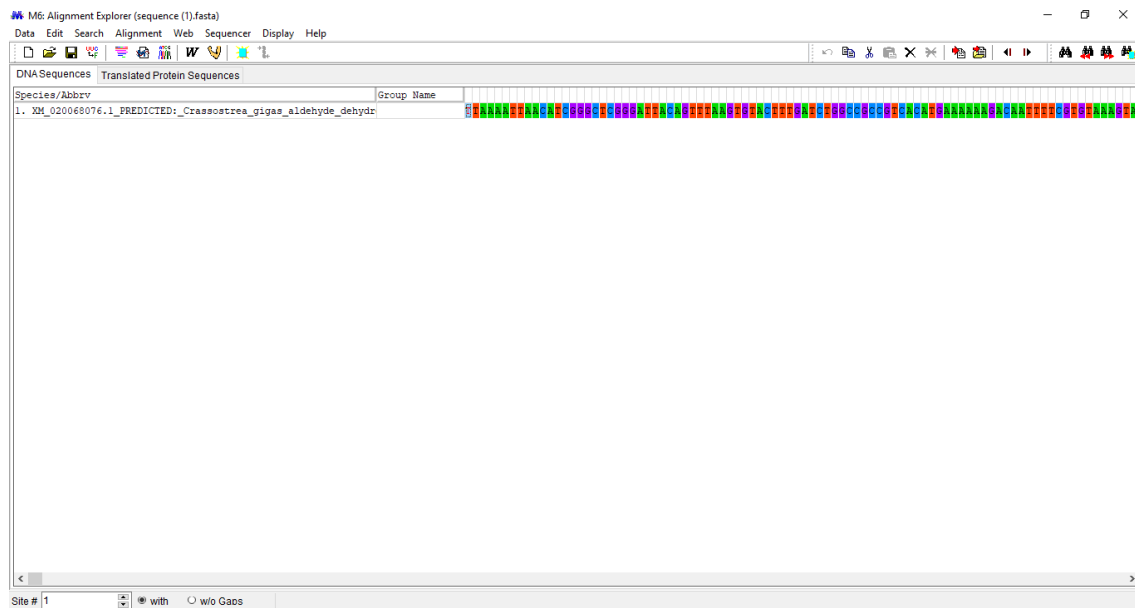
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

#### 4. Descargar en formato FASTA las secuencias de interés

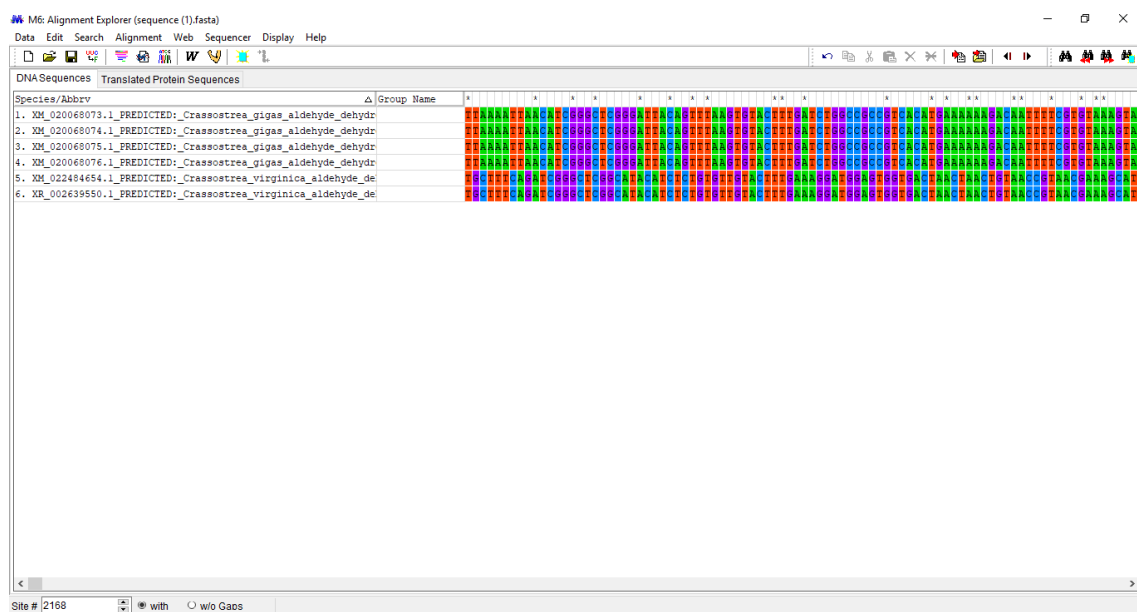
The screenshot shows the NCBI Nucleotide database interface. The search results for the sequence **PREDICTED: Crassostrea gigas aldehyde dehydrogenase family (LOC105330234), transcript variant X6, mRNA** are displayed. The NCBI Reference Sequence is XM\_020068076.1. The interface includes a 'Send to' dropdown menu with options: Complete Record, Coding Sequences, Gene Features, File (selected), Clipboard, Collections, and Analysis Tool. The 'Format' is set to FASTA, and the 'Show GI' checkbox is unchecked. A 'Create File' button is visible at the bottom of the dropdown menu.

#### 5. Desde el programa MEGA abrir las secuencias descargadas en FASTA.

The screenshot shows the MEGA 6.06(6140226) software interface. The 'File' menu is open, and the 'Open A File/Session ... Ctrl+O' option is highlighted. Below the menu, a file explorer window is open, showing the 'Descargas' (Downloads) folder. The file explorer displays several files, including 'CV kari 2018', 'CV karina (1)', 'CV karina', 'Kzapata 20', 'Lista cepas IB 2', and several files named 'sequence (1)', 'sequence (2)', 'sequence (3)', 'sequence (4)', and 'sequence (5)'. The 'sequence (1)' file is selected, and the 'Nombre:' field at the bottom shows 'sequence (1)'. The 'Abrir' (Open) button is visible.

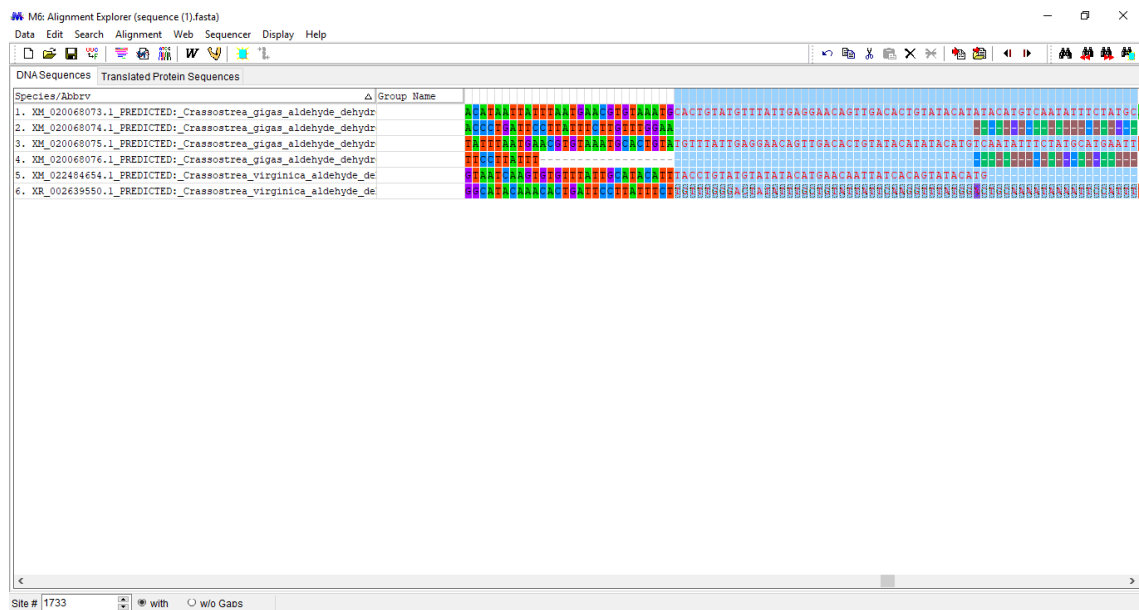


## 6. Insertar todas las secuencias a alinear.

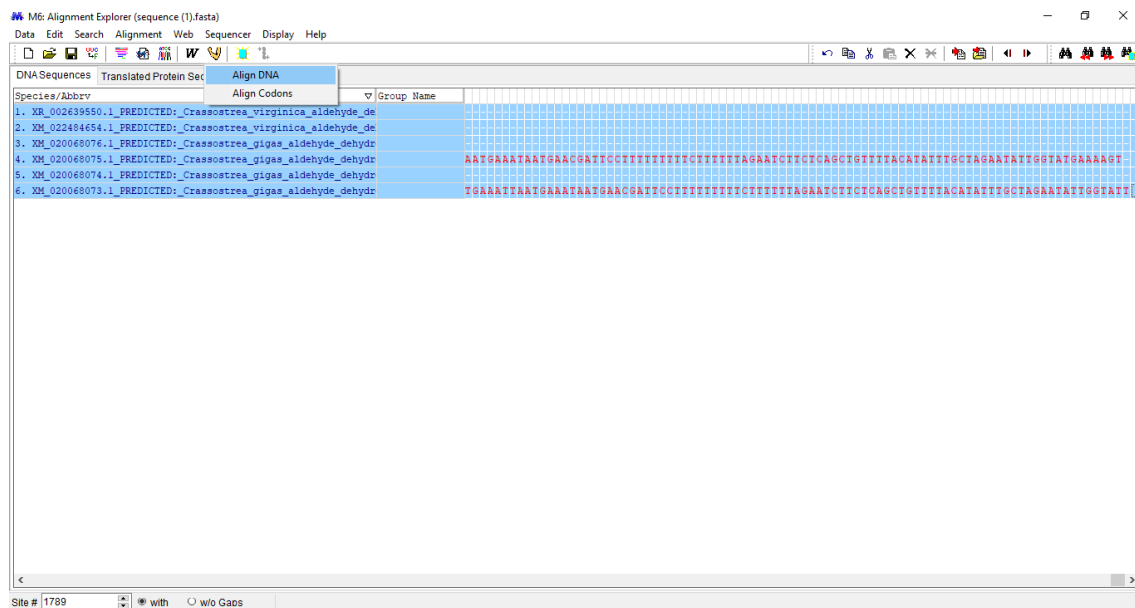


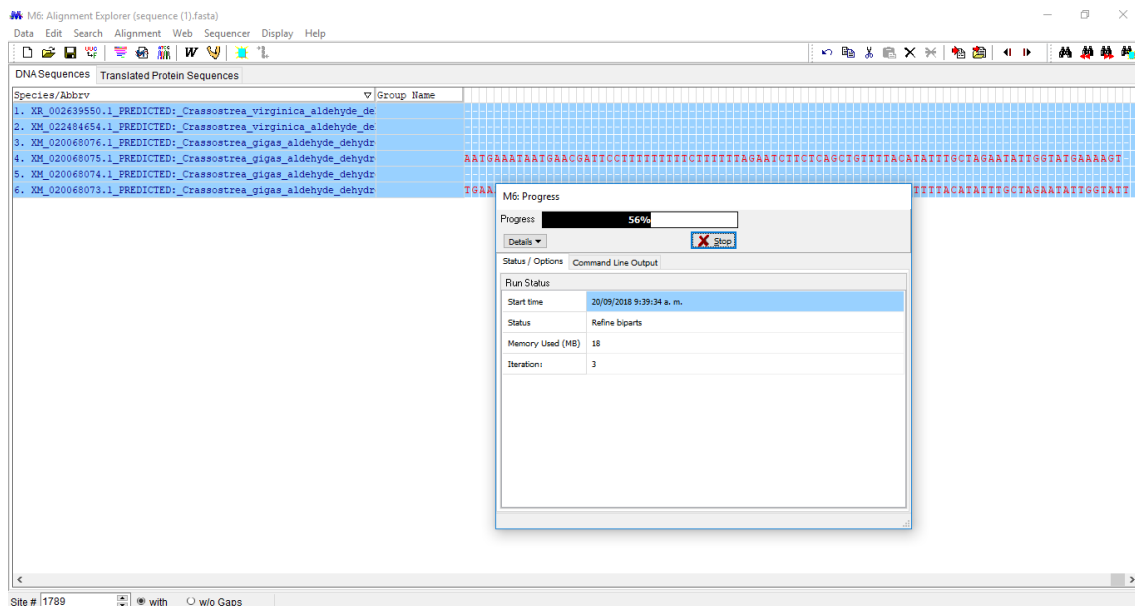
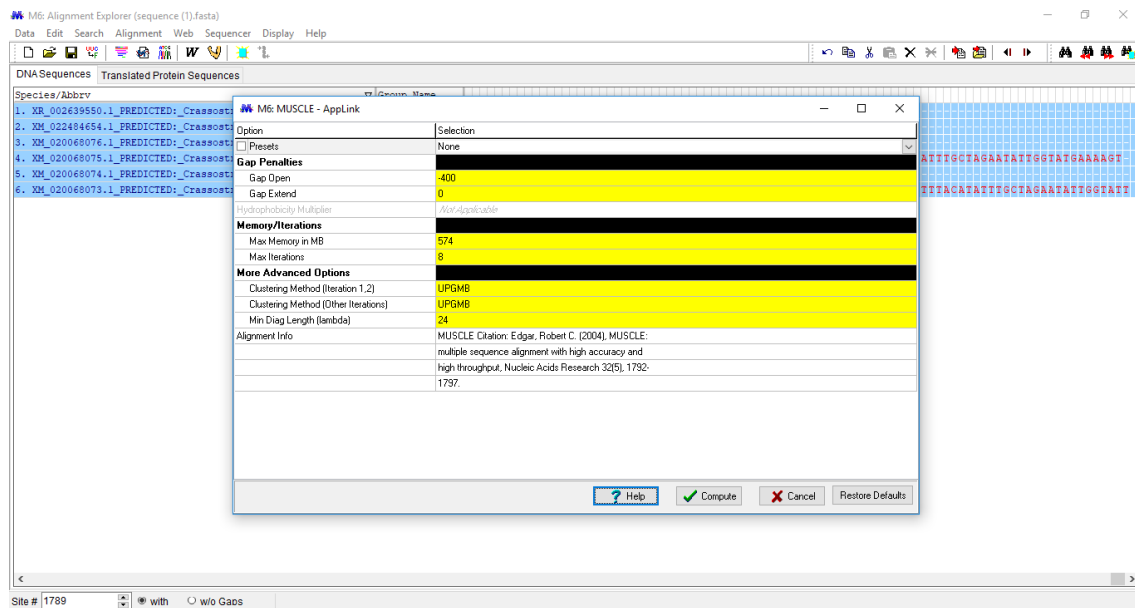


## 7. Seleccionar las secuencias.

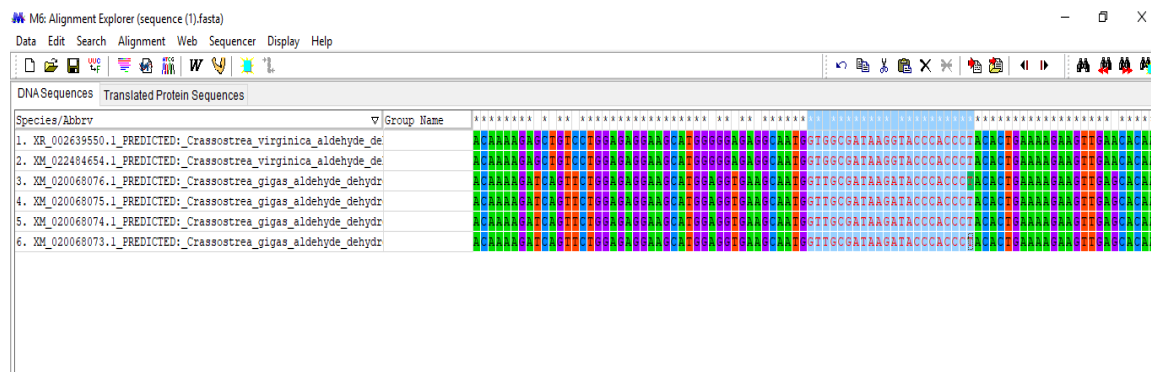


## 8. Alinear las secuencias de ADN con la opción MUSCLE.

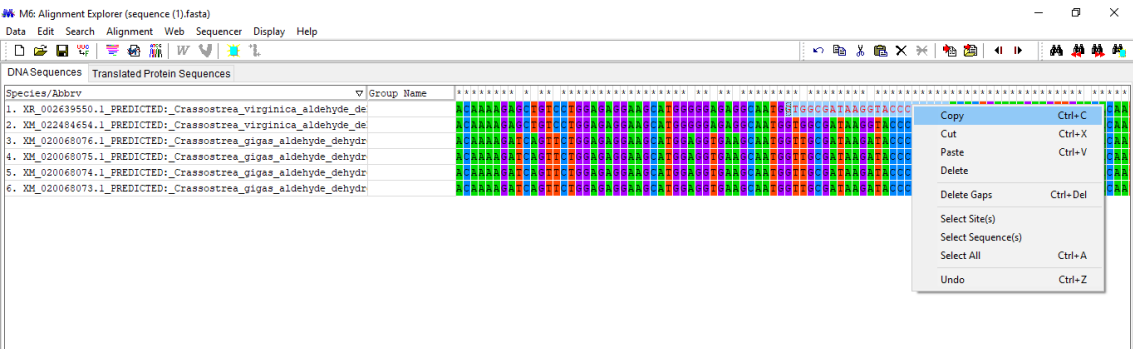




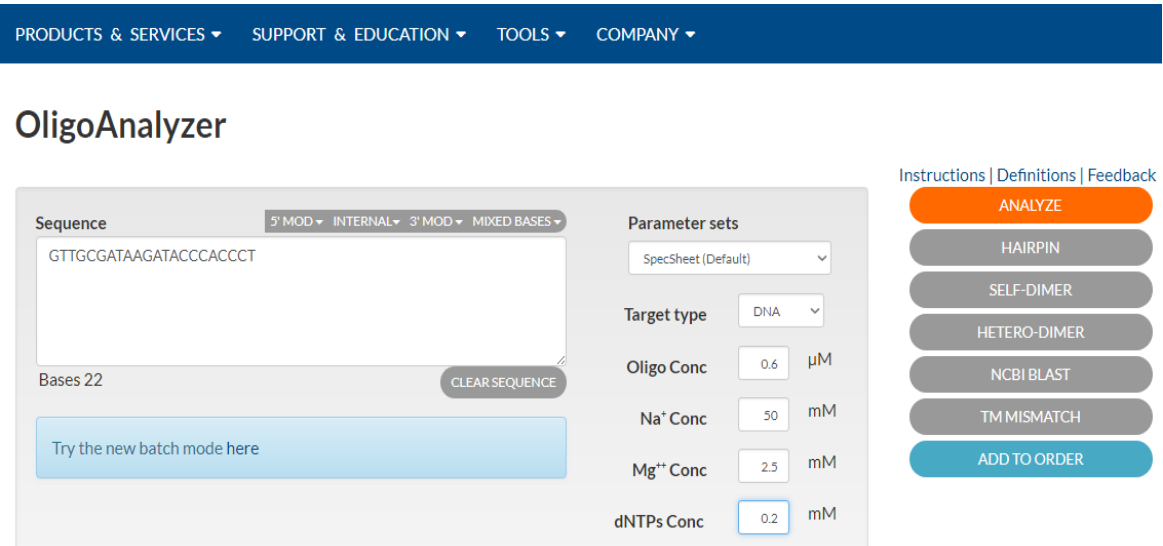
## 9. Seleccionar las regiones más conservadas de la alineación.



10. Copiar la secuencia candidata a ser el iniciador.



11. Verificar las propiedades del iniciador en el Programa OligoAnalyzer.



12. Evaluar los resultados arrojados por el programa OligoAnalyzer.

### Results

RESUSPENSIONDILUTION

SEQUENCE	5'- GTT GCG ATA AGA TAC CCA CCC T -3'
COMPLEMENT	5'- AGG GTG GGT ATC TTA TCG CAA C -3'
LENGTH	22
GC CONTENT	50 %
MELT TEMP	65.4 °C
MOLECULAR WEIGHT	6679.4 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	210300 L/(mole-cm)
nmole/OD <sub>260</sub>	4.76
μg/OD <sub>260</sub>	31.76

ANALYZE

HAIRPIN

SELF-DIMER

HETERO-DIMER

NCBI BLAST

TM MISMATCH

ADD TO ORDER

MELTING TEMPERATURE SETTINGS	
TARGET TYPE	DNA
OLIGO CONC	0.6 $\mu$ M
Na <sup>+</sup> CONC	50 mM monovalent salt
Mg <sup>++</sup> CONC	2.5 mM divalent salt
dNTPs CONC	0.2 mM nucleotide triphosphate

ANALYZE

HAIRPIN

SELF-DIMER

HETERO-DIMER

NCBI BLAST

## MELTING TEMPERATURE ASSUMPTIONS AND LIMITATIONS

Predictions are accurate for oligos from 8 to 60 bases in length, in neutral buffered solutions (pH 7 - 8) with monovalent cation ( $\text{Na}^+$ ) concentrations from 1.2 M down to 1.5mM, divalent cation ( $\text{Mg}^{++}$ ) concentrations from 600 mM down to 0.01 mM, and triphosphates (dNTPs) concentrations up to 120% of the divalent cation concentration.

Oligo concentration is assumed to be significantly larger (at least 6x) than concentration of the complementary target, which is true in majority of molecular biology experiments. If this is not a case, concentration of the target cannot be ignored and you should enter in the box,

- Oligo Conc =  $[\text{strand1}] - [\text{strand2}]/2$  when  $[\text{strand1}] \geq [\text{strand2}]$
- Oligo Conc =  $([\text{strand1}] + [\text{strand2}])/4$  when  $[\text{strand1}] = [\text{strand2}]$


### Melting temperature accuracy and models: (Oligo/Template)

DNA/DNA	+/- 1.4°C (Allawi '97)
LNA/DNA	+/- 2.0°C (McTigue '04, Owczarzy, 2011)
RNA/DNA	+/- 2.7°C (Sugimoto '95)
DNA/RNA	+/- 2.7°C (Sugimoto '95)
RNA/RNA	+/- 1.3°C (Xia '98)

- ANALYZE
- HAIRPIN
- SELF-DIMER
- HETERO-DIMER
- NCBI BLAST
- TM MISMATCH
- ADD TO ORDER

13. Evaluar los posibles Harpin que se formarían.

### General Information

 Image Batch date: 9/21/2018 12:27 AM

GTTGCGATAAGATACCCACCCT

Nucleotide type

DNA

Na Concentration

50 mM

Mg Concentration

2.5 mM

Suboptimality

50 %

Sequence type

Linear

Temperature

25 °C

Max Foldings

20

Start Position


0

Stop Position

0

UPDATE

ADD TO ORDER



ANALYZE

HAIRPIN

SELF-DIMER

HETERO-DIMER

NCBI BLAST

TM MISMATCH

ADD TO ORDER

## Structures

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> .mole <sup>-1</sup> )	Output
1		1.4	-44.7	-4.6	-20.14	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		1.55	-8.9	-12.1	-45.79	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
3		1.68	-20.1	-9.4	-37.15	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
4		1.72	-56	-4.6	-21.18	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
5		2	-13.9	-13.3	-51.31	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
6		2.03	-53.2	-5.7	-25.92	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
7		2.03	-14.5	-13.3	-51.41	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
8		2.21	-33.8	-9	-37.6	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
9		2.32	-22	-12.4	-49.37	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

ANALYZE

HAIRPIN

SELF-DIMER

HETERO-DIMER

NCBI BLAST

TM MISMATCH

ADD TO ORDER

## 14. Evaluar los Self-dimer

### Homo-Dimer Analysis

The delta G is calculated by taking into account the longest stretch of complementary bases. These pairs of complementary bases are represented by a solid line. Dotted lines represent additional complementary bases for that dimer structure, but their presence does not impact calculated delta G values. Actual delta G values may vary based on presence of additional complementary bases. The Maximum Delta G value refers to the free energy of the oligo sequence binding to its perfect complement.

#### Dimer Sequence:

5'- GTT GCG ATA AGA TAC CCA CCT -3'  
Maximum Delta G: -42.07 kcal/mole

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'          GTT GCG ATA AGA TAC CCA CCT
      : || :
3' TCC CAC CAT AGA ATA GCG TTG
  
```

ANALYZE

HAIRPIN

SELF-DIMER

HETERO-DIMER

NCBI BLAST

TM MISMATCH

ADD TO ORDER

## 15. Evaluar la formación de Hetero-Dimer con el iniciador anti-sentido.

AGAACCCGAACCAGGAAAGAA

### Hetero-Dimer Analysis

#### Primary Sequence:

5'- GTT GCG ATA AGA TAC CCA CCT -3'

#### Secondary Sequence:

5'- AGAACCCGAACCAGGAAAGAA -3'

CREATE COMPLEMENT CALCULATE

ANALYZE

HAIRPIN

SELF-DIMER

HETERO-DIMER

NCBI BLAST

TM MISMATCH

ADD TO ORDER

## Hetero-Dimer Analysis

The delta G is calculated by taking into account the longest stretch of complementary bases. These pairs of complementary bases are represented by a solid line. Dotted lines represent additional complementary bases for that dimer structure, but their presence does not impact calculated delta G values. Actual delta G values may vary based on presence of additional complementary bases. The Maximum Delta G value refers to the free energy of the oligo sequence binding to its perfect complement.

**Primary Sequence:** 5'- GTT GCG ATA AGA TAC CCA CCC T -3'  
**Secondary Sequence:** 5'- AGA ACC CGA ACC AGG AAAG AA -3'  
**Maximum Delta G:** -42.07 kcal/mole

**Delta G:** -4.67 kcal/mole **Base Pairs:** 3  
 5' GTT GCG ATA AGA TAC CCA CCC T  
                                   : |||  
 3'                   AAG AAAGG ACCAAG CCCAAGA

- [ANALYZE](#)
- [HAIRPIN](#)
- [SELF-DIMER](#)
- [HETERO-DIMER](#)
- [NCBI BLAST](#)
- [TM MISMATCH](#)
- [ADD TO ORDER](#)

## 16. Visualización en NCBI blast.

U.S. National Library of Medicine | NCBI National Center for Biotechnology Information | Sign in to NCBI

**BLAST®** » blastn suite | Home | Recent Results | Saved Strategies | Help

**Standard Nucleotide BLAST**

Enter Query Sequence | BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#) | [Reset page](#) | [Bookmark](#)

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) | Clear | Query subrange | From | To

Or, upload file | [Seleccionar archivo](#) | Ningún archivo seleccionado | Job Title | Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

**Choose Search Set**

Database | ☐ Human genomic + transcript | ☐ Mouse genomic + transcript | ☒ Others (nr etc.): | Nucleotide collection (nr/nt) | Organism | Optional | molluscs (taxid:6447) | ☐ Exclude | ☐ Models (XM/XP) | ☐ Uncultured/environmental sample sequences | Limit to | Optional | Sequences from type material | Enter Query | [YouTube](#) | [Create custom database](#)

Activar Windows | Ve a Configuración para activar Windows.

## 17. Obtener la Temperatura de Melting MISMATCH

**Primary Sequence:** 5' to 3'; **Target Sequence:** 3' to 5'

5'- GTT GCG ATA AGA TAC CCA CCC T -3'  
 3'- CAACGCTATTCTATGGGTGGGA -5'

Melting Temperatures

EXACT MATCH T <sub>M</sub>	56.6 °C
MISMATCH T <sub>M</sub>	56.6 °C
DELTA T <sub>M</sub>	0 °C

[Percent Bound](#) At 56.6 °C

- [ANALYZE](#)
- [HAIRPIN](#)
- [SELF-DIMER](#)
- [HETERO-DIMER](#)
- [NCBI BLAST](#)
- [TM MISMATCH](#)
- [ADD TO ORDER](#)